

Vergleichende Rheologie des Blutes

**Speziesunterschiede in der Verformbarkeit
und Aggregation der Erythrozyten**

Justus von Gosen

1977
—

Aus dem Physiologischen Institut der Universität
München

Direktoren: Professor Dr. med. K. Kramer

Professor Dr. med. K. Thureau

Professor Dr. med. E. Gerlach

Vergleichende Rheologie des Blutes:

Speziesunterschiede in der Verformbarkeit und Aggregation
der Erythrozyten

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
an der Ludwig Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Justus von Gosen

aus

Prien am Chiemsee

Jahr

1977

Mit Genehmigung des Fachbereichs Medizin der
Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med H. Schmid-Schönbein

Mitberichterstatter: Prof. Dr. med. K. Kramer

Dekan: Prof. Dr. med. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 12. Juli 1977



Meinen Eltern gewidmet

Meine Eltern

Meine Eltern

Meine Eltern

Meine Eltern

Meine Eltern

Meine Eltern

Meine Eltern

Meine Eltern

Meine Eltern

Meine Eltern

Meine Eltern

Meine Eltern

Meine Eltern

Meine Eltern

Meine Eltern

Meine Eltern

Meine Eltern

Meine Eltern

Meine Eltern

Meine Eltern

Meine Eltern

Meine Eltern

Meine Eltern

Meine Eltern

Meine Eltern

Meine Eltern

Meine Eltern

Meine Eltern

Meine Eltern

Meine Eltern

Meine Eltern

Meine Eltern

INHALTSVERZEICHNIS

1. Einleitung
2. Materialien und Methoden
 - 2.1.1. Tierspezies
 - 2.1.2. Blutgewinnung und Präparation
 - 2.2.1. Gegenrotatorisches Rheoskop
 - 2.2.2. Aggregometrie durch Lichttransmissionsmessung
 - 2.2.3. Viskometrie
 - 2.2.4. Filtration von Erythrozyten-Suspensionen durch Polykarbonatsiebe
 - 2.2.5. Verformung von Erythrozyten in hochviskösen Medien
3. Ergebnisse
 - 3.1. Viskometrie
 - 3.1.1. Nativblut
 - 3.1.2. Plasma
 - 3.1.3. Erythrozyten in autologem Plasma, Hct 45 %
 - 3.1.4. Fluidität gepackter Erythrozyten, Hct 95 %
 - 3.1.5. Diskussion der Viskometrie
 - 3.2. Mikroskopische Beobachtung von Erythrozyten in viskosimetrischer Strömung (Rheoskopie)
 - 3.3. Filtration der Erythrozytensuspensionen durch 5 μ Poren
 - 3.4. Photometrische Aggregometrie
 - 3.4.1. Korrelation von mikrorheologischem Verhalten mit der Lichttransmission von kleinen Blutproben im Rheoskop
 - 3.4.2. Diskussion der Aggregometrie
 - 3.5. Verformung von Erythrozyten in hochviskösen Medien
 - 3.5.1. Erythrozyten in Dextran 40 Lösung
 - 3.5.2. Erythrozyten in ultrafiltriertem Rinderserum
 - 3.5.3. Diskussion der Verformung in hochviskösen Medien
4. Allgemeine Diskussion
5. Zusammenfassung
6. Literaturverzeichnis

Die Rheologie des Blutes hat in den letzten Jahren im Bereich der Physiologie, aber auch in der klinischen wie experimentellen Medizin zunehmend Interesse gefunden. Besonders vielfältige Untersuchungen liegen über die Ursachen der sogenannten "anormalen Viskosität" des menschlichen Blutes vor. Darunter versteht man die Tatsache, daß die Viskosität des Blutes keine Konstante ist, sondern sich mit den Strömungsbedingungen (Strömungsgeschwindigkeit, bzw. Durchmesser des durchströmten Gefäßes) ändert. Diese Variabilität ist in den letzten Jahren für menschliches Blut auf zwei Faktoren, nämlich die Aggregation von Erythrozyten bei langsamer Strömung und die Deformation und Ausrichtung der Erythrozyten in schneller Strömung zurückgeführt worden (17/22/58/60/61/62/74).

Der Fülle der Daten über die Rheologie des menschlichen Blutes stehen viel weniger Experimente über die Rheologie des Blutes verschiedener Tierspezies gegenüber. Diese Tatsache ist insofern von Bedeutung als mit der Methode der Sedimentationsmessung des Blutes bereits eindeutige Unterschiede hinsichtlich des Aggregationsverhaltens dokumentiert worden sind (3/6/9/10/11/12/14/21/23/29/30/36/37/43/50/51/59/78).

Da die Korrelation der Fließeigenschaft in vitro mit dem Fließverhalten in vivo jedoch in erster Linie durch Tierexperimente angegangen werden muß, ist eine genauere Untersuchung der Fließeigenschaften von Tierblut unter den definierten Fließbedingungen in vitro Voraussetzung für das Verständnis des Fließverhaltens in vivo.

Man kann davon ausgehen, daß das Fließverhalten des Blutes, vor allem die Strömung desselben in der Endstrombahn, d.h. in den kleinsten Gefäßen wie Arteriolen, Kapillaren und Venolen beeinflussen dürfte. Die überwiegende Mehrzahl der in der Literatur vorliegenden Daten über das Fließverhalten des Blutes in vivo ist jedoch an Hamster, Ratte und Kaninchen

gewonnen worden, Tierspezies, über deren Blutrheologie nur sehr wenige Einzelheiten bekannt waren. Die beobachteten Phänomene, insbesondere Zellaggregationsphänomene bei langsamer Strömung, entsprechen jedoch, wenigstens qualitativ, der intravasalen Erythrozytenaggregation, wie sie auch am Menschen beobachtet worden ist. Weder bei den beobachteten Tieren, noch beim Menschen ist es jedoch bis heute mit Sicherheit geklärt, inwieweit die Zellaggregationsphänomene in vivo eine Folge oder die Ursache der gleichzeitig bestehenden Strömungsverlangsamung bzw. Stase ist. In dem schwierigen Versuch, diese zentrale Frage der Hämorheologie zu beantworten, ist es daher notwendig:

1. Das normale Aggregationsverhalten der in der Allgemeinphysiologie und besonders der Mikrozirkulationsphysiologie benützten Versuchstiere zu quantifizieren,
2. damit eine Vergleichsmöglichkeit zu normalem und zu pathologisch verändertem menschlichen Blut zu haben, ehe man
3. unter physiologischen und pathologischen Zuständen das in vitro mit dem in vivo Verhalten korrelieren kann.

Die vorliegende Arbeit hat sich daher die Aufgabe gestellt, die Rheologie des Blutes bei den üblichen Versuchstieren, ferner bei einigen schon früher durch ihre Besonderheit bekannt gewordenen Spezies, wie Rinder (keine Aggregation) und Pferde (sehr starke Aggregation) mit neueren mikrorheologischen Versuchen noch einmal zu überprüfen. Um auch das Blut sehr kleiner Labortiere quantitativ untersuchen zu können, mußten dabei besondere Mikromethoden entwickelt werden. Hierbei wurde besonderer Wert auf die mikroskopische Beobachtung der Strömungsphänomene und deren Dokumentation gelegt, Dadurch war es möglich, die Interpretation der Messungen durch simultane Photographie besser abzusichern. Neben der Viskosität des Blutes wurde die Verformbarkeit, die Ausrichtung der Erythrozyten in schneller Strömung, bzw. ihre Aggregation bei

langsamer Strömung bei verschiedenen Tierarten untersucht und untereinander mit menschlichem Blut verglichen. Frühere Hypothesen, die zur Erklärung der rheologischen Phänomene des menschlichen Blutes aufgestellt wurden, konnten gleichzeitig anhand der verschiedenen tierischen Befunde überprüft und ggf. erweitert werden.

2. Materialien und Methoden

2.1.1. Tierspezies

Es wurden folgende Tierspezies untersucht (die Anzahl der untersuchten Individuen ist jeweils in Klammern angegeben): Hund (8), Katze (12), Ratte (10), Goldhamster (16), Meerschweinchen (8), Kaninchen (8), Rind (20), Pferd (8), Schwein (10), Truthahn (2) und Mensch (14).

2.1.2. Gewinnung und Präparation der Blutproben:

Das Blut wurde von Hund, Katze, Pferd, Kaninchen und Mensch nach Gefäßpunktion mit einer Spritze entnommen, von Ratte, Meerschweinchen und Goldhamster in Narkose bei geöffnetem Thorax durch Punktion des Herzens. Als Narkotikum wurde Äther, bei den Ratten ein Thiobarbiturat intraperitoneal (Inaktin[®] 80 mg/kg Körpergewicht) verwendet. Das Blut von Rind und Schwein wurde im Schlachthaus aufgefangen.

Als Antikoagulans wurde durchweg dem Blut eine 7,5 %ige EDTA-Lösung im Verhältnis 1 : 50 zugesetzt, was einer Endkonzentration von 1,5 mg EDTA/ml Blut entspricht und wobei eine nennenswerte Verdünnung des Plasmas vermieden wurde. Das so antikoagulierte Blut wird in dieser Arbeit als "Nativblut" bezeichnet. Das gewonnene Blut wurde zentrifugiert (3 Minuten, 8000 g), das Plasma abgenommen und die Leukozyten über den Erythrozyten (buffy coat) sorgfältig entfernt. Zur Messung der Aggregation wurden dann die Erythrozyten im homologen Plasma resuspendiert, wobei jeweils ein bestimmter Hämatokritwert eingestellt wurde. Zu Messungen der Zellverformbarkeit durch Filtrationsmessungen (siehe unten) wurden die Erythrozyten zunächst dreimal in einer phosphatgepufferten isotonischen Kochsalzlösung gewaschen. Die Lösung hat die folgende Zusammensetzung:

NaCl: 143 mMol/l; Na_2HPO_4 : 11,5 mMol/l; NaH_2PO_4 : 6,4 mMol/l.
der pH wurde auf 7,4 eingestellt.

Zur Messung der Verformbarkeit in hochviskösen Medien wurden Rindererythrozyten in einer 35 %igen Lösung von Dextran 40 und außerdem in eingedicktem Rinder Serum untersucht. Das System Rindererythrozyten in eingedicktem Rinder Serum wurde gewählt, weil Vorversuche ergeben haben, daß nach Konzentration der Serumproteine die Rindererythrozyten auch bei den niedrigsten Schergraden nur zu einer sehr geringen Aggregation neigen. In einem solchen System ist es möglich, die Verformung und Orientierung einzelner Erythrozyten in viskosimetrischer Strömung bei relativ niedrigen Schergraden zu untersuchen.

Zu diesem Zweck wurde das Serum zunächst mit Millipore®-Filtern Typ RA von groben Partikeln befreit. Die Eindickung wurde mit Diaflow Ultrafiltration Membranes XM-50 (Amicon Cooperation) bei 4 °C und einem Druck von 4,5 atü in besonderen Druckfiltrationskammern durchgeführt.

Die Osmolarität vor und nach Filtration wurde mit Hilfe eines Dampfdruckosmometers (Dr. Knauer, Berlin) kontrolliert und durch Zugabe von kristallinem NaCl oder Aqua bidest auf einen Wert von 285 mosmol/l eingestellt.

Blutproben:

Die zu messenden Blutproben wurden durch Zugabe des Plasmas zu gepackten Erythrozyten (Hct: 95 - 98%) auf verschiedene Hämatokritwerte eingestellt:

Zur Viskosimetrie auf 45 % bzw. 95 %

Zur Lichttransmissionsmessung auf 33 %

Zur Filtration durch 5 µm Poren auf 10 %

Zur Messung der Verformbarkeit in hochviskösen Medien auf 5 %

Alle Hämatokritwerte wurden mit einer Mikrohämatokritzentrifuge ($1,5 \times 10^4$ Upm, 9 cm $\rightarrow$ 5 cm; r = Abstand des Blutes von der Drehachse) bestimmt. Die Werte sind nicht für das eingeschlossene Plasma korrigiert worden (13/18/19). Mit Hilfe besonderer Mikropipetten war es möglich, auch aus kleinen Volumina von Erythrozyten bzw. Plasma, die entsprechenden Hämatokritwerte reproduzierbar einzustellen. Der pH und die Partialdrucke von CO₂ und O₂ wurden nicht kontrolliert, die Proben

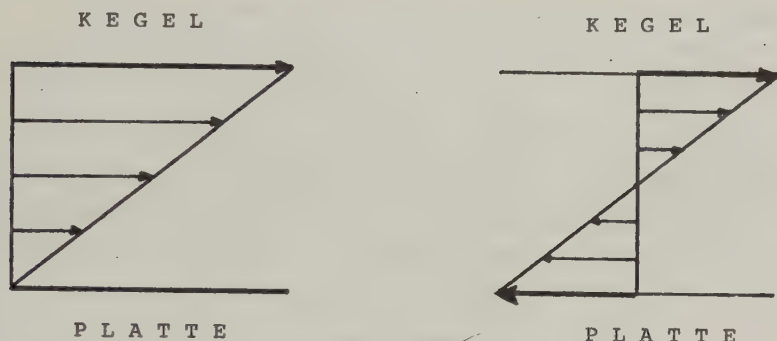
aber möglichst unter Verschuß gehalten. Vor der Messung wurden die Proben vorsichtig gemischt. Alle Blutproben wurden vor, während und nach der Messung mikroskopisch überprüft und nur solche Proben, deren Erythrozyten normale Bikonkavität aufwiesen, wurden bei den Ergebnissen berücksichtigt. Diese Maßnahme war notwendig, weil bestimmte Tierspezies speziell Goldhamster, Ratten, Meerschweinchen, Kaninchen, Hund und Katze zur spontanen Ausbildung von Steckäpfeln neigen. Diese Stechapfelbildung war auch nicht durch Verwendung von Plastikgeräten (Reagenzgläser, Objektträger und Deckgläser) bzw. Zugabe von ATP oder Erhöhung des PO_2 zu verhindern (1/32/33/39/47/49/81).

Diese äußerst störende Stechapfelbildung interferiert sowohl mit der Verformbarkeit als auch mit der Aggregation der Zellen. Es war daher notwendig, die rheologischen Eigenschaften der Blutproben so schnell wie möglich, in der Regel innerhalb von 10 Minuten nach Blutentnahme, abzuschließen. Dennoch kann nicht ausgeschlossen werden, daß auch schon in dieser Zeit die in vivo bestehenden mechanischen Eigenschaften der Erythrozyten verändert waren und damit die Ergebnisse verfälscht sind. Gegen diese Annahme spricht allerdings, daß die Fähigkeit der Erythrozyten, Poren von 5 μm Durchmesser zu passieren, in der Regel nur unerheblich gestört war. Die umfangreichen Vorbereitungen zur Präparation gewaschener Erythrozyten zur Filtration ließen sich nicht innerhalb der 10 Minuten-Grenze durchführen.

2.2.1. Rheoskopie

Unter Rheoskopie verstehen wir die mikroskopische Beobachtung von Blut, welches in einer transparenten Platte-Kegelkammer einer viskometrischen Strömung mit definierten Schergraden unterworfen wird. In früheren Versionen des Rheoskops (54/56) rotierte nur der Kegel; deshalb bewegten sich für den Beobachter alle Schichten in Abhängigkeit der Winkelgeschwindigkeit, dem Abstand von der Drehachse und der Höhe zwischen Platte und Kegel.

Geschwindigkeitsprofile im herkömmlichen und gegenrotatorischen Rheoskop:



Man konnte also Teilchen nur im begrenzten Blickfeld verfolgen und auch das nur bei niedrigen Schergraden bzw. geringer Vergrößerung. Außerdem war keine exakte mikroskopische Beleuchtung möglich, welche für alle speziellen Optiken unbedingt erforderlich ist.

Wir entwickelten daher eine neue Version des Rheoskops (68), es rotiert die Platte im Uhrzeigersinn und der Kegel entgegen dem Uhrzeigersinn um eine gemeinsame Achse, welche symmetrisch durch die Kegelspitze und senkrecht zur Platte verläuft. Dadurch entsteht wiederum eine sogenannte viskometrische Strömung, wobei jedoch in der Mitte zwischen Platte und Kegel eine von beiden Seiten her gescherte Schicht für den Beobachter stillsteht.

Durch geeignete konstruktive Maßnahmen (siehe Abb.) wurde Platz für die Optik gewonnen: von oben wird das untersuchte Blut mit einem Kondensor beleuchtet. Die Beobachtung mit verschiedenen Objektiven findet von unten statt, sodaß die Verwendung eines invertierten Mikroskops nötig wurde.

Die konstruktiven Einzelheiten sind in Abbildung 1 festgehalten. Der Kegel (1) besteht aus Plexiglas und ist in der Kegelfassung (2) befestigt. Der Kegel wird so gefaßt und in der Drehbank bearbeitet, daß die Kegelspitze in der Längsach-

se der Fassung liegt. Die Kegelfassung selbst sitzt konisch in einem Kegelhalter (3). Die Platte (4), ein Deckgläschen ist auf eine Metallscheibe (5) geklebt, die justierbar auf dem Plattenhalter (6) sitzt. Kegel und Plattenhalter sind am drehbaren, inneren Ring (I) je eines Kugellagers (7) befestigt und werden durch einen Gummikegel (8) jeweils in entgegengesetzte Drehung versetzt. Die äußeren Ringe der Kugellager (Ä) sind parallel gelagert und hinsichtlich ihres gemeinsamen Mittelpunkts durch besondere Einstellschrauben (9) justierbar.

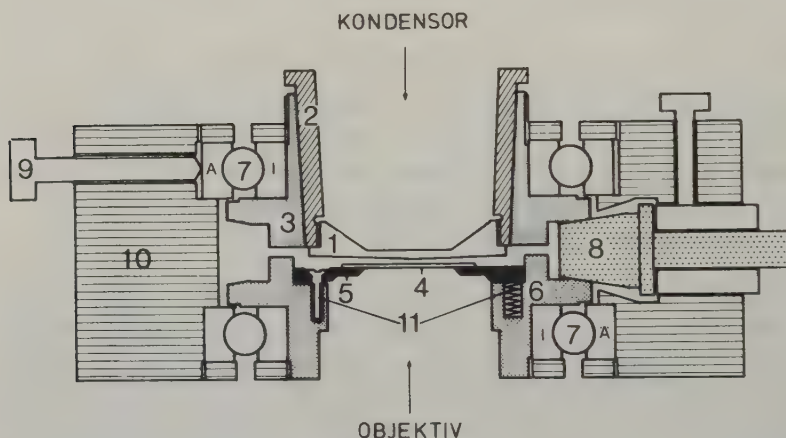


Abb. 1: Schnittbild der gegenrotatorischen Rheoskopkammer, Details siehe Text

Mit besonderen Federlagern (11) läßt sich auch die Höhe und Laufgenauigkeit des Plattenhalters justieren. Die Höhe und der Lauf der Platte sowie die Konzentrität der beiden Lager werden mittels Meßuhren auf $\pm 1\mu\text{m}$ justiert. Dabei wird so eingestellt, daß die Kegelspitze gerade die Platte berührt, wobei die oben genannten Bedingungen für die Drehachsen zu erfüllen sind. Die Kegel sind an der Spitze 1,5 mm dick und der Winkel zwischen Platte und Kegel beträgt $1^{\circ}30'$. Für andere

Untersuchungen z.B. die Rheologie der Blutplättchen können jedoch Kegel mit anderen Winkeln eingesetzt werden, außerdem ist es möglich, als Platte Kunststoff, bzw. silikonisiertes Glas zu verwenden.

Durch einen elektronischen Regelantrieb (Fa. SWF, Bietigheim Württemberg Nr. 600.971) wird über ein besonderes Getriebe der Antriebskegel in Rotation versetzt. Der Schergrad errechnet sich wie folgt:

$$\dot{\gamma} = \frac{\Omega_{\text{Kegel}} - \Omega_{\text{Platte}}}{\tan \alpha} \quad \text{sec}^{-1}$$

Ω = Winkelgeschwindigkeit

α = Winkel zwischen Platte und Kegeloberfläche

Bei der verwendeten Version des sogenannten "gegenrotatorischen Rheoskops" ließen sich die Schergrade kontinuierlich zwischen 1,65 und 79, bzw. zwischen 11,5 und 626 sec^{-1} variieren.

Der elektronische Regelantrieb ließ sich so schalten, daß außer einer durch Potentiometer vorgewählten Umdrehungsgeschwindigkeit (und damit Schergrad) schlagartig geschaltet werden konnte auf:

1. Stop (Stase)
2. den jeweils vorgewählten minimalen Schergrad (1,65 bzw. 11,5) sec^{-1} und
3. der maximale Schergrad (79 bzw. 626 sec^{-1}).

Außerdem ist es möglich, die Rotationsrichtung durch einfache Schaltung umzukehren. Die gesamte Apparatur ist auf ein invertiertes Mikroskop montiert, sie wird zunächst vorsichtig dem Objektiv genähert, anschließend wird von oben der Kondensor eingesetzt. Zwischen Objektiv und Kondensor ist somit die Kammer montiert. Zunächst wird die Drehachse von Platte und Kegel mit der optischen Achse von Objektiv und Kondensor zur Deckung gebracht. Daran anschließend wird das Beobachtungsfeld nach peripher hin verschoben, wobei mittels einer weiteren Meßuhr der Abstand des Beobachtungsortes von der Kegelspitze kontrollierbar wird.

Es sind alle Objektive bis 100 x Ölimmersion verwendbar, mit entsprechenden Objektiven und Kondensoren ist die Beleuchtung in Durchlicht-, Dunkelfeld-, Phasenkontrast- und Interferenzkontrastmikroskopie möglich. Als Lichtquelle dient entweder eine Niedervoltlampe oder eine Quecksilber-Stroboskoplampe (Fa. Chetwick & Helmuth, Strobex 100). Bei 50 Lichtblitzen/sec ist die Flimmerverschmelzfrequenz für das menschliche Auge überschritten, so daß der Eindruck einer Dauerbeleuchtung entsteht. Über einen besonderen Schaltmechanismus lassen sich jedoch auch Einzelblitze für mikrophotographische Aufnahmen, bzw. stroboskopische Beleuchtung bei Mikrokinematographie gewinnen, wobei das Stroboskop durch den Verschluß der Filmkamera (Arriflex 16 mm) getriggert wird. In der Regel wurde das mikroskopische Strömungsverhalten der Zellsuspensionen in einem Abstand r zwischen 500 und 1000 μm von der Kegelspitze beobachtet. Schichtdicke d der Blutprobe errechnet sich nach der Formel:

$$d = r \cdot \operatorname{tg} \alpha$$

wobei α = Winkel zwischen Platte und Kegeloberfläche ist. In der Mehrzahl der Untersuchungen, von welchen in der Folge berichtet werden wird, betrug demnach die Schichtdicke 13 bis 26 μm .

Die Kammer in ihrer gegenwärtigen Version eignet sich nicht zur Thermostatisierung; bei dem kleinen Probenvolumen (10 bis 20 μl) kann jedoch davon ausgegangen werden, daß sich die Probe rasch an die Zimmertemperatur (ca. 23°C) equilibriert hatte. Frühere objektive Untersuchungen über die Temperaturabhängigkeit des Strömungsverhaltens menschlichen Blutes hatten gezeigt, daß zwischen 37°C und ungefähr 20°C keine signifikanten, vor allem nicht qualitativ entscheidene Veränderungen aufgetreten waren (67).

2.2.2. Aggregometrie durch Lichttransmissionsmessung

Zur qualitativen Erfassung des Aggregationsverhaltens der Erythrozyten im Blut verschiedener Tiere wurde der Einfluß auf

die Lichttransmission der Suspension benützt. Die Kriterien der quantitativen photometrischen Aggregometrie sind anderenorts beschrieben (6/49/64/70/71/79/80/84/85/86). Allerdings war es notwendig, die Methode für mikroskopische Volumina geringfügig abzuwandeln (68). Als Lichtquelle für die photometrische Aggregometrie diente eine spannungsstabilisierte Mikroskopglühlampe (6V/15W); die Messungen wurden mit einem 6,3 x Objektiv durchgeführt, ein Selensperrschicht-Photoelement wurde auf ein 10 x Okular montiert. Die Photospannung wurde kontinuierlich auf einem Kompensationsschreiber (Servogor RE 543, Fa. Metrawatt) registriert. Die Spannung der Photozelle bei Dunkelheit wurde gleich 0 gesetzt.

Gemessen wurde in einem Abstand von $r = 1500 \mu\text{m}$ von der Kegelspitze, die hierbei durchstrahlte Dicke des Blutes ist im Mittel $39,3 \mu\text{m}$ dick. Da die im Prinzip mögliche, gleichzeitige Messung von Lichttransmission und photographischer Registrierung umständlich ist und die Zeit der Messungen unnötig verlängert hätte, wurden die beiden Experimente häufig getrennt an zwei Modellen des oben beschriebenen Rheoskops, jedoch simultan durchgeführt. In der Regel wurden die photometrischen Registrierungen an einem Modell durchgeführt, das geringfügig andere Übersetzungsverhältnisse aufwies, so daß hier die Schergradbereiche zwischen 1,23 und 626, routinemäßig zwischen 12,5 und 626 sec^{-1} variierten. Dabei wurde routinemäßig wie folgt vorgegangen: zunächst wurde das Blut maximal schnell (bei 626 sec^{-1}) geschert, dann wurde schrittweise in einzelnen Stufen der Schergrad reduziert (auf etwa 319, 258, 196, 135, 104, 73, 43, 27 und $12,5 \text{ sec}^{-1}$). Zwischen jedem dieser Schritte wurde das Blut wiederum maximal (bei 626 sec^{-1}) geschert, um die jeweils gebildeten Aggregate wieder zu dispergieren und außerdem der Sedimentation der Erythrozyten bzw. der Erythrozytenaggregate entgegenzuwirken. Die Geschwindigkeit der Erythrozytenaggregation in Stase wird durch die schnelle Registrierung der Änderung der Lichttransmission möglich, welche auftritt, wenn eine schnell gescherte Blutprobe

plötzlich zum Stop gebracht wird. Hierbei nimmt die Lichttransmission zunächst schnell ab, um dann mit unterschiedlicher Geschwindigkeit wieder zuzunehmen (es entsteht ein sogenanntes Syllektogramm (6/84/86)). Wie an derer Stelle ausführlich beschrieben, ist die Geschwindigkeit der sekundären Zunahme der Lichttransmission ein Maß für die Geschwindigkeit, mit welcher sich die in der Strömung dispergierten Erythrozytenaggregate reformieren. (Für Einzelheiten der Methode siehe 44/70/71/79).

2.2.3. Viskometrie

Zur Makroviskometrie wurden Rotationsviskosimeter (Wells-Brookfield 1/2 x LVT, 1 x LVT, 10 x LVT) mit verschiedenen Viskosimeterkammern benützt:

1. Die Originalausführung mit Platte-Kegelanordnung, wobei je nach Bedarf ein Kegelwinkel mit $1,5^\circ$ (Schergradbereich: 1,15 bis 460 sec^{-1}) oder Kegel $0,8^\circ$ (Schergradbereich: 2,3 bis 920 sec^{-1}) gewählt wurde.
2. Eine Couette Kammer (66, Typ II)
Schergradbereich: 0,23 bis 92 sec^{-1} und
3. eine kombinierte Platte-Kegel-Couette Kammer "Mooney" Konfiguration, (66, Typ I)
Schergradbereich: 0,38 bis $157,3 \text{ sec}^{-1}$.

Die letztere Strömungskammer ist besonders günstig, da ihr Füllungsvolumen mit 2,1 ml gering ist, sie ebenso wie die Couette-Kammer einen Schutzring gegen Oberflächenartefakte besitzt und für Sedimentationsartefakte weniger anfällig ist als die Platte-Kegelanordnung. Die bisher beschriebenen Viskosimeter eignen sich lediglich zur Erfassung mittlerer und hoher Schergrade. Eindentige viskometrische Unterschiede zwischen aggregierenden und nicht-aggregierenden Blutproben sind jedoch lediglich bei Schergraden deutlich unter 1 sec^{-1} zu erwarten. Zum Vergleich des Viskositätsverhaltens von physiologischerweise aggregierenden Blutproben (Menschenblut) und physiologischerweise nicht-aggregierender Blutproben (Rinderblut) wurde daher ein WEISSENBERG Rheogoniometer Typ R 17 mit einer "Mooney" Meßkammer

verwendet, welches uns durch die freundliche Vermittlung von Herrn Professor Pakat im Institut für Physikalische Chemie der Technischen Universität München zugänglich wurde. Dieses Gerät erlaubt es, in einem Bereich zwischen $0,0178$ bis 178 sec^{-1} Blutviskositätsmessungen durchzuführen (69).

Bei allen Viskosimetern wird die Temperatur mit Hilfe eines Durchlaufthermostats eingestellt und in der Regel auf $37 \pm 0.5^\circ\text{C}$ konstant gehalten.

2.2.4. Filtration von Erythrozytensuspensionen (Hct. 10%)

Die Verformbarkeit von menschlichen Erythrozyten ist in der Vergangenheit wiederholt durch Meßanordnungen quantifiziert worden, bei denen Zellen gezwungen werden, sich durch Poren mit einem Durchmesser von $5 \mu\text{m}$ in Polykarbonatfolien von $11 \mu\text{m}$ Dicke zu zwängen (24/34/35/37/65).

Bei der verwendeten Anordnung (65) wird hierbei die Flußrate des suspendierenden Mediums (in der Regel Plasma, bzw. ein $1/8$ mit isotonischer, gepufferter Kochsalzlösung verdünntes Plasma) gemessen (durch Feststellung der Zeit, welche ein gegebenes Volumen für die Passage braucht); daran anschließend wird die Flußrate einer 10 %igen Suspension von Erythrozyten in dem gleichen Medium gemessen. In unseren Experimenten wurden die sogenannten "Nuclepore"-Filter[®] (General Electrics, Pleasantown, California/USA) verwendet, welche in besondere Strömungskammern montiert wurden, die es erlaubten, die Flußrate unter konstantem Druck (ΔP 500 mm - 10 mm H_2O , in der Regel 50 mm H_2O) und bei einer Temperatur von 37°C zu messen. Die Flußrate des suspendierenden Mediums ($\dot{V}_{pl}$) und die Flußrate der Suspension ($\dot{V}_{Susp}$) wurde jeweils dreimal gemessen, aus den Mittelwerten wurde die relative Flußrate ($\dot{V}_{rel}$) errechnet. Das hier geschilderte Verfahren ergab wesentlich reproduzierbarere Resultate als die Filtration von 2 %igen Erythrozytensuspensionen durch Millipore[®] bzw. Sartorius[®]-Faserfilter (siehe auch 65).

2.2.5. Verformung von Erythrozyten in viskometrischer Strömung bei Verwendung von hochviskösen Medien:

Da die Erythrozyten sich nicht lediglich bei der Passage durch die engen Poren, bzw. durch die nutritiven Kapillaren des Körpers verformen, sondern auch in viskometrischer Strömung einer ständigen Verformung unterliegen, (17/44/57/58/59/60/61/68/69/83) wurde dieses Verhalten in dem gegenrotatorischen Rheoskop ebenfalls untersucht. In einer Strömung dieser Art werden die Erythrozyten bei Überwindung eines kritischen Schubspannungswertes an der Grenzfläche zwischen Zellen und kontinuierlicher Phase aus ihrer vertrauten bikonkaven Ruheform gebracht und in Ellipsoide verformt, welche mit ihrer Hauptachse parallel zur Strömung angeordnet sind (57/59/61/69). Dieses Verhalten läßt sich besonders gut in der gegenrotatorischen Kammer verfolgen, da die kritischen Schubspannungen, vor allem bei Verwendung von isoviskösem Plasma, sehr groß sind. Da die an der Grenzfläche einwirkende Schubspannung ein Produkt aus der Viskosität der kontinuierlichen Phase (η) und dem vorgegebenen Schergrad ($\dot{\gamma}$) ist, kann Grad und Ausmaß der Verformung umso leichter verfolgt werden, je höher die Viskosität des Mediums sind. Das Orientierungs- und Deformierungsverhalten der Erythrozyten vom Rind und Schwein wurde in einer Lösung von Dextran 40 000 (mittleres Molekulargewicht 40 000, 35 g%, ergibt eine Viskosität von etwa 60 cP) untersucht. In einem solchen Medium ließen sich jedoch die Erythrozyten, außer in einem Vorversuch, nicht über längere Zeit in ihrer physiologischen bikonkaven Ruheform halten. Vielmehr stellte sich heraus, daß sowohl menschliche als auch Schweine- und Rindererythrozyten innerhalb weniger Minuten in sogenannte Stomatozyten übergingen, d.h. eine konvexkonkave Form annahmen und dann schließlich gar in Kugelform mit Einstülpungen der Membran übergingen. Da auch diese Veränderungen mit den uns zur Verfügung stehenden Mitteln nicht zu verhindern waren, und man davon ausgehen muß, daß Membranveränderungen schon eintreten ehe diese lichtmikroskopisch sichtbaren Formveränderungen nachweisbar sind, entschlossen wir uns, die Erythrozyten in einem "physiologischeren" Medium zu untersuchen.

Die Erhöhung der Viskosität einer Kolloidlösung ist nicht ohne weiteres möglich. Bei Zugabe von Albumin zu Plasma ist es schwierig, Werte über 20 cP zu erreichen, außerdem fand sich bei den meisten von uns verwandten Albuminchargen ebenfalls eine Umwandlung der Erythrozyten zu Stomatozyten.

Eindickung menschlichen Plasmas ergab zwar kräftige Viskositätserhöhung, gleichzeitig war jedoch die Aggregation der Erythrozyten so stark gesteigert, daß sehr hohe Kräfte zur Dispersion aufgewandt werden mußten, welche dann immer sofort zu einer sehr ausgeprägten Erythrozytendeformation Anlaß waren.

Wir machten daher Gebrauch von der schon lange bekannten Tatsache, daß Rindererythrozyten im Plasma keine Erythrozytenaggregate bilden (29). Nach Eindickung von Rinderplasma durch die oben beschriebene Ultrafiltration zeigte sich dann doch, daß auch die Rindererythrozyten zu einer typischen, wenn gleich sehr schwach ausgeprägten Geldrollenbildung fähig sind, sobald man nur das Rinderplasma auf etwa das 10-fache der Norm eindickt.

Verwendet man dagegen eingedicktes Rinderserum, so ist diese Aggregation geringer und unter diesen Versuchsbedingungen ist es möglich, in Stase längere Zeit monodisperse Erythrozyten zu haben, welche sich dann bei sehr geringen Zunahmen der Schubspannung orientieren und deformieren (siehe unten). Ohne Schwierigkeiten gelang es, Serumkonzentrate mit einer Viskosität von 165 cP, 42 g% Protein herzustellen, welche dann durch Verdünnung mit dem Ultrafiltrat bzw. gepufferter, isotonischer Kochsalzlösung auf beliebige Viskositätswerte wieder verdünnt werden konnte. Für die Aufnahmen im Rheoskop wurden Suspensionen mit einem Haematocritwert von 5 % und Serumviskositäten zwischen 165 und 14 cP, 27 g% Protein verwandt. Unter dem Einfluß viskosimetrischer Strömung richteten sich die Zellen aus, sie verformen sich in Ellipsoide, so daß das Ausmaß der Verformung durch die mathematische Beschreibung der Elliptizität (siehe unten) numerisch quantifizierbar ist.

Tabelle I

Tierspezies	Viskosität η (cP) bei Schergrad		Hct (%)	Plasma viskosität (cP)
	3,9 sec ⁻¹	157,3 sec ⁻¹		
Kaninchen	4.5 $\pm$ 0.8	2,5 $\pm$ 0.2	35 $\pm$ 3,5	1,17 $\pm$ 0.08
Meersch.	5.6 $\pm$ 1,8	2,9 $\pm$ 0.4	45 $\pm$ 2,2	1,22 $\pm$ 0.14
Goldhamster	5.7 $\pm$ 0.6	3,4 $\pm$ 0.2	46 $\pm$ 1.8	1,32 $\pm$ 0.09
Katze	6.6 $\pm$ 1.5	3.3 $\pm$ 0.4	41 $\pm$ 4.8	1,33 $\pm$ 0.07
Hund	7.7 $\pm$ 2,6	4.1 $\pm$ 0.8	44 $\pm$ 8.9	1,44 $\pm$ 0.06
Ratte	8.1 $\pm$ 2.1	3.8 $\pm$ 0.4	44 $\pm$ 3.7	1.21 $\pm$ 0.09
Pferd	11.4 $\pm$ 1,8	4.2 $\pm$ 0.3	39 $\pm$ 4.1	1,38 $\pm$ 0.08
	4,6	92 sec ⁻¹		
Rind	8,2 $\pm$ 1,5	5.7 $\pm$ 0.4	40 $\pm$ 3.5	1,79 $\pm$ 0.17
Schwein	7.8 $\pm$ 1,9	3,8 $\pm$ 0.3	40 $\pm$ 2.1	1,53 $\pm$ 0.12
Mensch	9.0 $\pm$ 1,2	4.8 $\pm$ 0.7	44 $\pm$ 2	1,25 $\pm$ 0.09

Tabelle I: Nativblut, Viskosität bei 2 Schergraden, Hämatocrit, Plasmaviskosität, 37 ° C (Mittelwert und Standardabweichung)

3. Ergebnisse

3.1. Viskosimetrie:

3.1.1. Nativblut

Das Blut aller untersuchten Spezies zeigt sogenanntes "Nicht-Newton'sches" Verhalten, d.h. bei allen Spezies nahm die scheinbare Viskosität des Blutes mit steigenden Schergraden ab. Absolut gesehen, ist das Kaninchenblut am dünnflüssigsten, während Pferdeblut, besonders bei niedrigen Schergraden die höchste, scheinbare Viskosität aufweist. (Abb. 2)

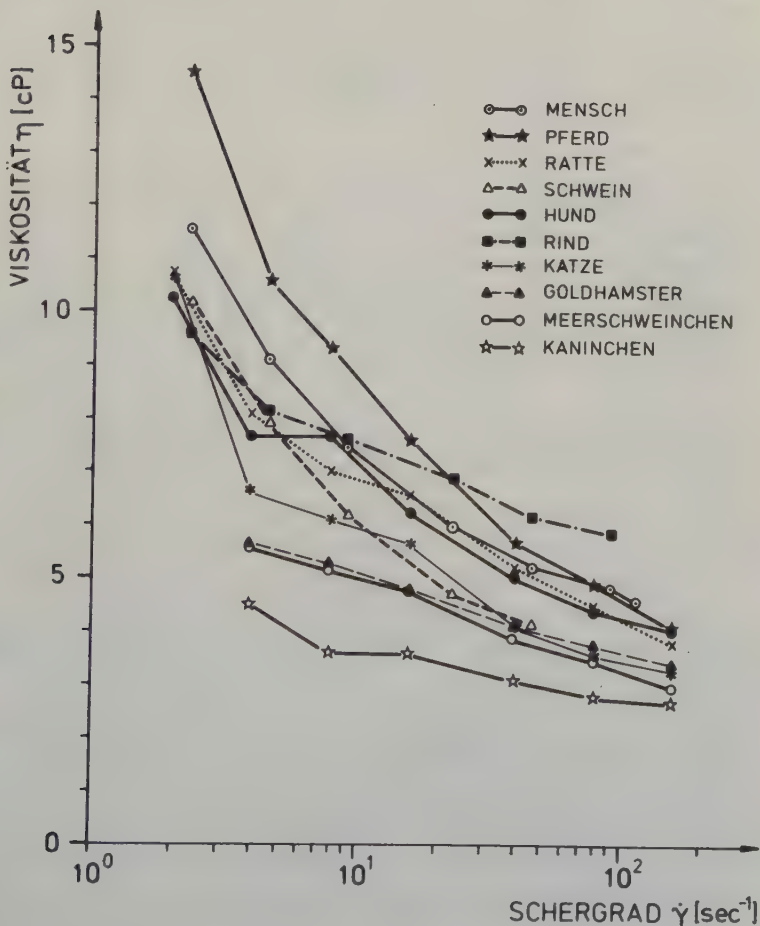


Abb. 2: Viskositätsprofile von Nativblut, 37 °C, scheinbare Viskosität als Funktion des Schergrades aufgetragen

Auffallenderweise zeigte Rinderblut bei den hohen Schergraden durchweg höhere Werte als alle anderen Spezies, inklusive Mensch (Tabelle I).

Das Blut derjenigen Spezies, deren Erythrozyten bei niedrigen Schergraden aggregierten (siehe unten), hatte hier deutlich höhere Viskositätswerte als bei hohen Schergraden. In unserem Untersuchungsgut waren dies die Proben des Menschen, des Schweines, des Hundes, der Katze und der Ratte. Die Tierspezies mit fehlender oder schwach ausgeprägter Erythrozytenaggregation (Rind, Goldhamster, Kaninchen und Meerschweinchen) hatten dagegen bei niedrigen Schergraden auch niedrige Werte der scheinbaren Blutviskosität.

Die bloße Messung der scheinbaren Blutviskosität in Rotationsviskosimetern ist von geringen hämodynamischen wie heuristischem Wert. Hämodynamisch relevant ist sie lediglich für die kleine Minderheit der großkalibrigen Gefäße des Organismus, während in der überwiegenden Mehrzahl der Endstrombahn ein anderer Viskositätswert angenommen werden muß. Dies beruht auf der bekannten Tatsache, daß mit abnehmendem Gefäßkaliber und schneller Strömungsgeschwindigkeit die scheinbare Blutviskosität absinkt (Fahraeus-Lindqvist Effekt). Die heuristische Signifikanz des Wertes der scheinbaren Blutviskosität ist beeinträchtigt durch die Tatsache, daß in ihm eine Reihe Faktoren wie Plasmaviskosität, Hämatokritwert, Entmischungsphänomene zwischen Plasma und Erythrozyten bzw. Erythrozytendeformation eingehen. In den herkömmlichen Viskositätsmessungen können alle diese Faktoren nicht voneinander getrennt werden, lediglich der ebenfalls wichtige Faktor Temperatur kann konstant gehalten werden. Die erheblichen Varianzen und absoluten Unterschiede im Hämatokritwert des Nativblutes (Tabelle I) bedingen die große Varianz der scheinbaren Viskosität.

3.1.2. Desgleichen fanden sich große Differenzen in der Viskosität des Plasmas (Tab. I). Hierbei ist festzuhalten, daß die mit weitem Abstand höchste Viskosität bei den Rindern gefunden wurde. Ferner fand sich bei den Pferden, Schweinen und Hunden eine signifikant höhere Plasmaviskosität als beim Mensch, während Kaninchen, Meerschweinchen und Ratte eine geringfügig niedrigere Viskosität als der Mensch aufweist. Letztere Gruppe von Tieren zeigte auch eine geringere Erythrozytenaggregation (siehe unten), erstere eine gleichstarke oder stärkere als der Mensch. Katze (mit sehr starker Aggregation) und Goldhamster (mit sehr geringer Aggregation) hatten dagegen gleiche Plasmaviskosität.

In unseren Untersuchungen wurden diejenigen früherer Autoren mit wesentlich empfindlicheren Viskosimetern bestätigt, die fanden, daß die Plasmaviskosität innerhalb des Meßfehlers der Instrumente nicht von dem Schergrad abhängen. (Plasma kann also als "Newton'sche Flüssigkeit" aufgefaßt werden.) Die absolute Höhe der Plasmaviskosität ist eng korreliert mit

1. der Eiweißkonzentration und
2. der Anwesenheit makromolekularer und vor allem anisotroper Proteine.

Die Analyse der Faktoren, welche die Plasmaviskosität beeinflussen, ist deswegen außerordentlich kompliziert und würde den Rahmen der jetzigen Arbeit bei weitem sprengen. Der absolute Wert der Plasmaviskosität ist aus verschiedenen Gründen von großem Interesse. Wenn man davon ausgeht, daß in der Mehrzahl der kleinen Gefäße die Blutviskosität, aufgrund des Fahraeus-Lindqvist Effektes, sich der Plasmaviskosität annähert, so muß man davon ausgehen, daß die Plasmaviskosität eine Art limitierender Faktor der Blutströmung in der großen Mehrzahl aller Blutkapillaren ist. Aufgrund des Fahraeus Effektes kann also die Viskosität des Menschenblutes in den Kapillaren auf einen Wert absinken, der $\frac{2}{3}$ des Wertes ausmacht, auf den die Viskosität des Rinderblutes absinken kann. Aufgrund der Verformbarkeit der Erythrozyten wirkt die Plasmaviskosität

auch auf den gemessenen Wert der scheinbaren Blutviskosität ein (siehe unten).

3.1.3. Damit Speziesunterschiede in der scheinbaren Blutviskosität sichtbar werden, die nicht auf Hämatokritdifferenzen zurückzuführen sind und welche deswegen durch andere Faktoren (Verformbarkeit der Erythrozyten bzw. Aggregationsverhalten der Erythrozyten) bedingt sein müssen, wurde der Hämatokrit auf 45 % eingestellt. Die Abbildungen 4 bis 14 zeigen Werte der relativen, scheinbaren Viskosität (Quotient aus scheinbarer Viskosität und Viskosität des Plasmas als Funktion der jeweils erreichten Schubspannung. Zum Vergleich wurde jeweils das Profil der relativen scheinbaren Viskosität von Menschenblut eingezeichnet. Diese Form der Darstellung wurde gewählt, da es die Schubspannung ist, die zu einer Änderung im mikrorheologischen Verhalten der Blutzellen und damit in der scheinbaren Viskosität führt. Ob allerdings der jeweils durch Messung an der Gesamtsuspension ermittelte, mittlere Schubspannungswert auch tatsächlich am einzelnen, an der Grenzfläche zwischen dem einzelnen Erythrozyten und seiner plasmatischen Umgebung wirkt, ist fraglich (siehe unten).

Diese Art der Darstellung erlaubt es, nun ganz deutliche Unterschiede zwischen den verschiedenen Tierspezies herauszuarbeiten.

Abbildung 3 zeigt zunächst die absolute scheinbare Viskosität als Funktion der Schubspannung. Nimmt man etwa einen Schubspannungswert von 6 dyn/cm^2 , schwankt die Blutviskosität zwischen 2,5 und 6 cP, wobei das Meerschweinchen mit 2,5 cP den niedrigsten, das Rind mit 6 cP den höchsten Wert aufweist.

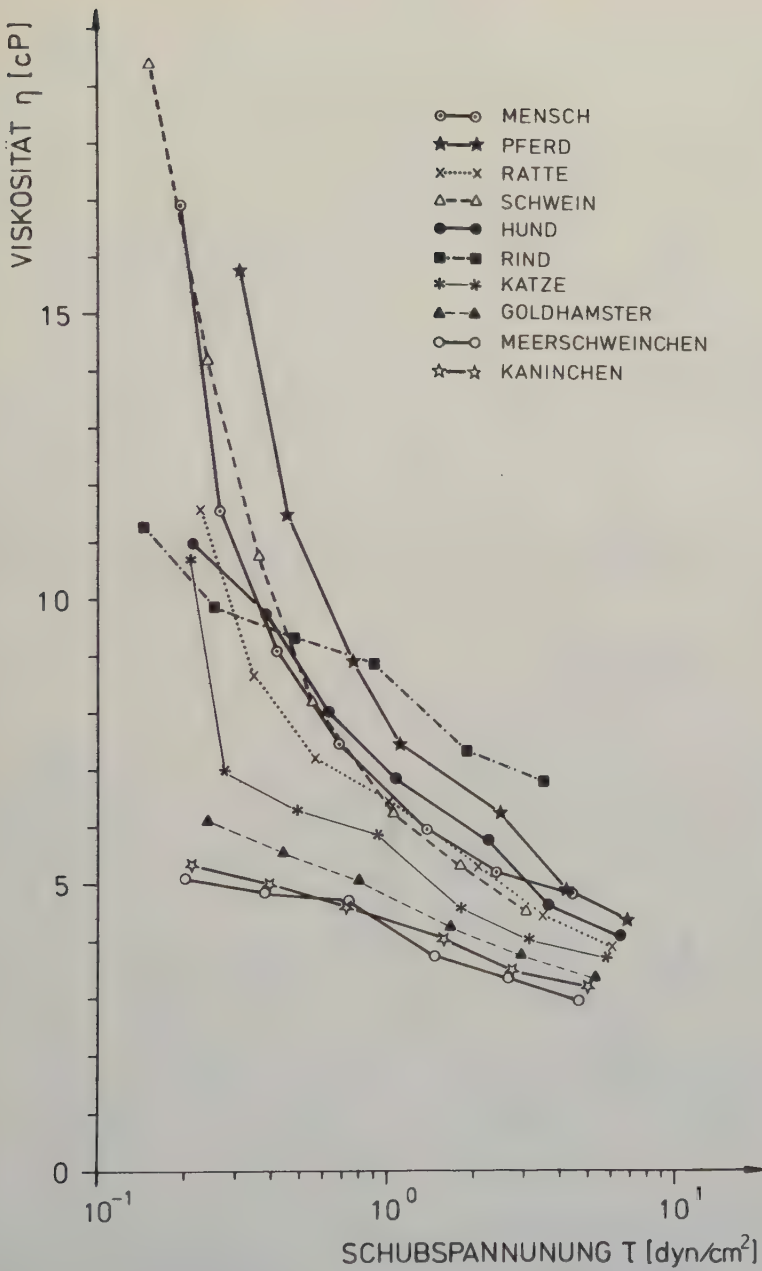


Abb. 3: Viskositätsprofile von Blut mit Hct 45 %, 37° C
(Mittelwerte)

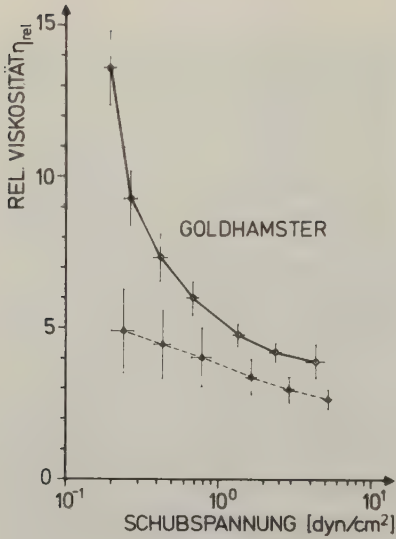


Abb. 4:

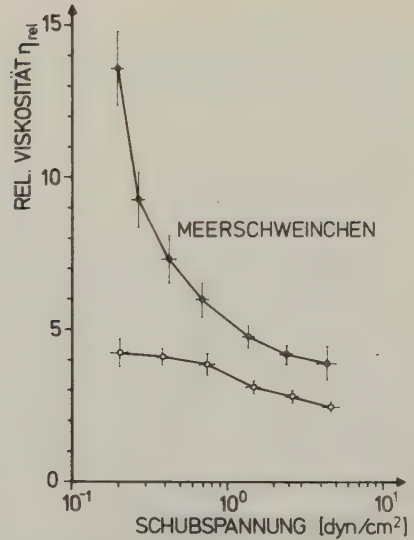


Abb. 5:

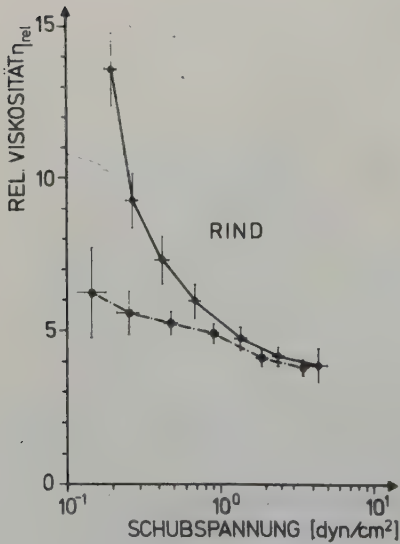


Abb. 6:

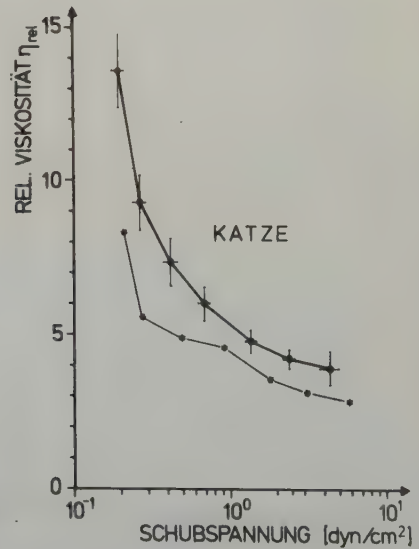


Abb. 7:

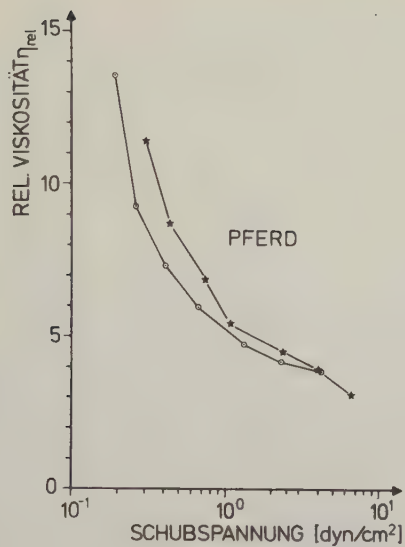


Abb. 8:

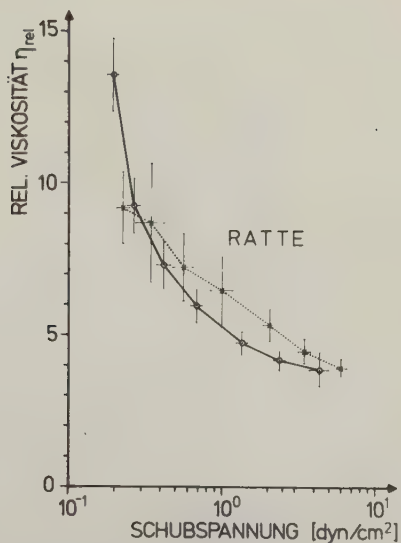


Abb. 9:

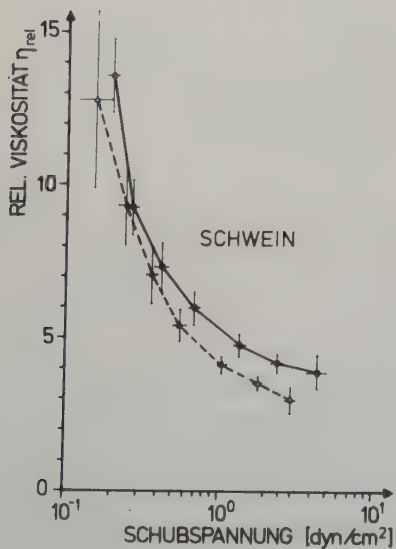


Abb. 10:

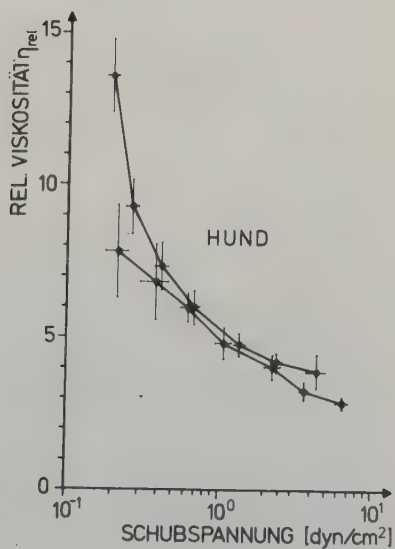


Abb. 11:

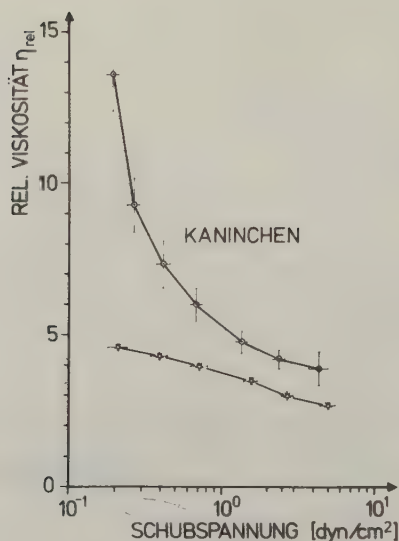


Abb. 12:

Abb. 4 - 12: scheinbare, relative Viskosität der Spezies
im Vergleich zum Menschen ○—○
Hct. 45 %, 37 ° C

Abb. 13 zeigt demgegenüber den Wert der scheinbaren, relativen Viskosität. Die Werte sind immer noch deutlich variabel, die Reihenfolge ist jedoch z.T. geändert. Den niedrigsten Wert zeigt wiederum das Meerschweinchen, den höchsten Wert dagegen die Ratte. Da beide Tierspezies eine wenig ausgeprägte Aggregation zeigen, d.h. bei einem Schubspannungswert von 6 dyn/cm² mit an Sicherheit grenzender Wahrscheinlichkeit vollständig dispergiert sind, muß daraus geschlossen werden, die Erythrozyten des Meerschweinchens und die der Ratte sich in unterschiedlicher Weise an die Strömung anpassen in dem

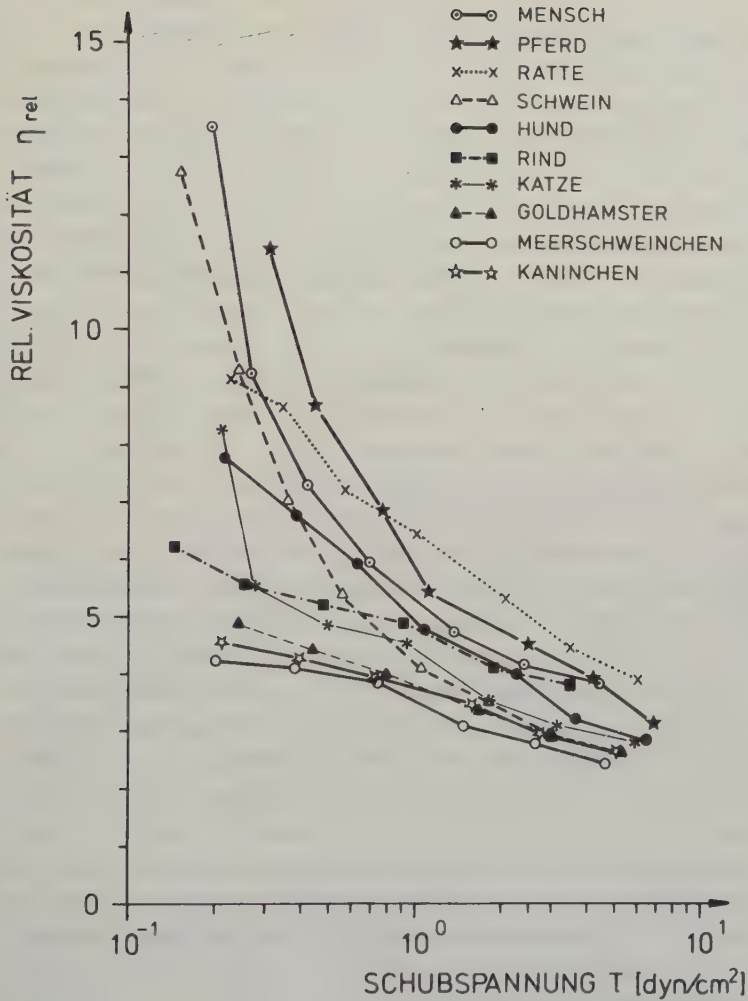


Abb. 13: scheinbare relative Viskositäten
verschiedener Spezies im Vergleich zum
Menschen ○—○
Hct. 45 %, 37° C, Mittelwerte

Sinne, daß die Rattenerythozyten weniger, die Meerschweinchenerythrozyten dagegen mehr strömungsanpassungsfähig sind.

Bei einem Wert von 6 dyn/cm^2 liegen jetzt auch die Werte der Rinder ganz in der Nähe derjenigen für den Menschen, was die Deutung bestätigt, daß der hohe Wert der scheinbaren Blutviskosität beim Rind im wesentlichen bedingt ist durch die hohe Plasmaviskosität. Im übrigen zeigen die Abbildungen 4 - 13, daß der Wert für die relative scheinbare Blutviskosität bei hohen Schubspannungen für alle Spezies mit Ausnahme des Pferdes und der Ratte etwas niedriger liegen als die für den Menschen. Mit anderen Worten, daß bei hohen Schubspannungen die Erythrozyten dieser Spezies besser an die Strömung angepaßt sind als die des Menschen. Die Kurven für Ratte und Pferd (Abbildung 8 und 9) zeigen allerdings jeweils Überkreuzungen: beim Pferd überkreuzen sich die Kurven im Bereich hoher Schubspannungen. Das Pferdeblut liegt offenbar lediglich bei niedrigen Schubspannungen höher als der Mensch, was vermutlich bedingt ist durch die sehr ausgeprägte Erythrozytenaggregation dieser Tiere (siehe unten). Demgegenüber müssen für das Rattenblut andere Mechanismen diskutiert werden, hier liegt nämlich im Bereich niedriger Schubspannungen das Rattenblut tiefer als das Menschenblut, was mit der Beobachtung geringerer Erythrozytenaggregation bei dieser Spezies gut korreliert. Die geringfügig höheren Werte bei mittleren und hohen Schubspannungen sind nicht ohne weiteres zu deuten, da zwar die Passagefähigkeit der Rattenerothrozyten durch $5 \mu\text{m}$ Poren deutlich geringer ist als die der menschlichen Erythrozyten, die Fluidität dichtgepackter Zellsuspensionen von Rattenerothrozyten (Hämatokritwert 95 %) fast ebenso hoch ist, wie die des Menschen (Abb. 16). Möglicherweise beeinflusst auch das Barbiturat (Inaktin®) die Erythrozyten (5).

Die gewählte Art der Darstellung viskometrischer Ergebnisse zeigt klar die mikrorheologischen Besonderheiten. Goldhamster (Abb. 4), Meerschweinchen (Abb. 5) und Kaninchen (Abb. 12) zeigen . sehr geringfügige, leicht durch Scherung dispergierfähige Erythrozytenaggregate, außerdem ausgeprägte Strömungsanpassung. Dementsprechend liegen bei ihnen die Profile der

relativen, scheinbaren Viskosität im gesamten gemessenen Bereich deutlich tiefer als beim Menschen. Die Katze, das Schwein, das Pferd und der Hund, welche mit dem Menschen vergleichbare Erythrozytenaggregation aufweisen, zeigen auch ein vergleichbares Viskositätsprofil, das Rind (Abb.6), bei dem keine Aggregation besteht, zeigt lediglich bei niedrigen Schubspannungswerten einen deutlich tieferen Wert als der Mensch, um sich dann bei hohen Schubspannungswerten an die Werte für menschliches Blut anzugleichen.

3.1.4. Fluidität gepackter Erythrozytensuspensionen (Hct. 95%, 37°C)

Die Fließfähigkeit einer dichtgepackten Aufschwemmung von Erythrozyten kann bei einem Hämatokritwert von über 90 % als Maß für die Verformbarkeit des einzelnen Erythrozyten herangezogen werden (41/42/57/58/59/60/61).

Die Fluidität (rhe. d.h. der reziproke Wert der Viskosität) ist ein Maß für diese Fließfähigkeit

$$\text{rhe} = \frac{1}{\eta_{\text{app}}} \quad (\text{cm}^2 / \text{dyn} \times \text{sec} = \text{P}^{-1})$$

Die bloße Tatsache, daß die Erythrozytensuspensionen aller hier untersuchten Tierspezies bei einem Hämatokritwert über 95 % noch fließen, ist ein Ausdruck der Verformbarkeit der einzelnen Erythrozyten. Wie die Abb. 14 zeigt, nimmt bei menschlichen Erythrozyten die Fluidität für jeden gegebenen Hämatokritwert mit zunehmender Schubspannung zu, desgleichen mit Abnahme des Hämatokritwertes. Der besseren Übersichtlichkeit wegen wurde die halblogarithmische Darstellung gewählt (Abb. 14). Abbildung 15 zeigt den Vergleich der verschiedenen untersuchten Tierspezies. Die geringste Fluidität der gepackten Zellen zeigte hierbei das Schwein, die höchste das Pferd, bzw. die Katze (siehe Abb. 16). Die Werte dieser beiden Spezies wurden deswegen gesondert dargestellt (Abb. 15 und 16).

Bei der Analyse der in Abbildung 14, 15 und 16 dargestellten Befunde muß allerdings berücksichtigt werden, daß die Messung der Fluidität von gepackten Erythrozyten zwar technisch sehr einfach ist, jedoch mannigfaltigen Fehlermöglichkeiten unterliegt. Diese hängen nicht nur mit der Anfälligkeit der Erythrozyten für Steckapfelbildung zusammen, sondern sind vor allem durch den starken Einfluß nur geringfügiger Veränderungen im Hämatokritwert zu erklären (siehe Abb. 14). In dem für uns gewählten Bereich von Hct. 95 % ist eine exakte Bestimmung des tatsächlichen Hämatokritwertes

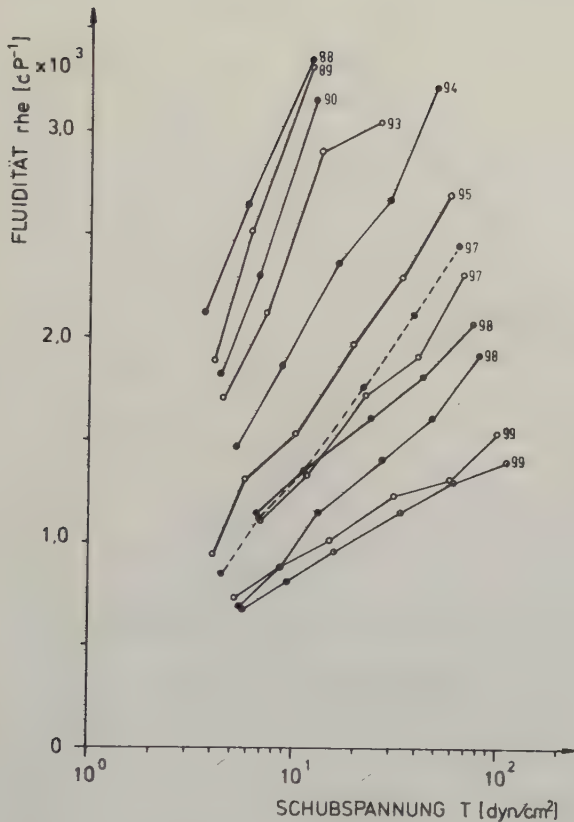


Abb. 14: Fluidität gepackter menschlicher Erythrozyten im Plasma bei variablen Hämatokrit, 37° C

problematisch: Unterschiede in der Verformbarkeit der Erythrozyten gehen nämlich bereits in die Präparation der Suspension ein. Tierspezies, deren Erythrozyten weniger gut verformbar sind, lassen sich durch zentrifugieren auch weniger dicht packen. Im Experiment wirken daher zwei einander entgegengesetzte Faktoren: geringere Verformbarkeit führt dazu, daß der gemessene Hämatokritwert wesentlich

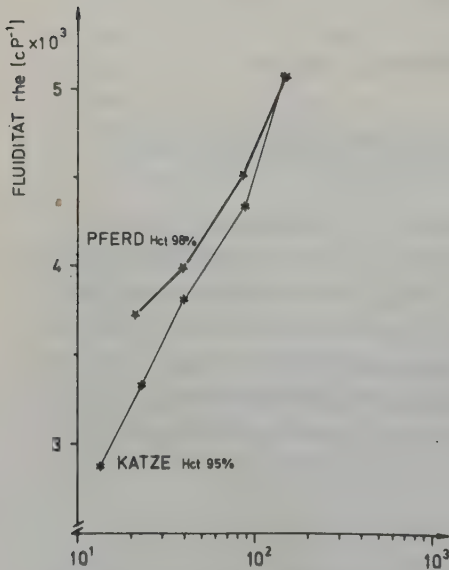
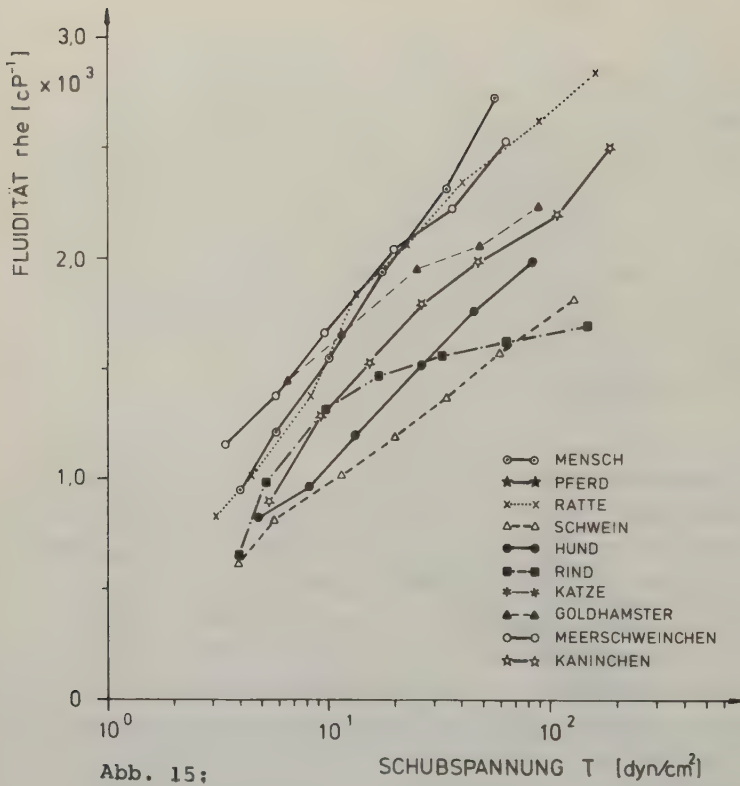


Abb. 15, 16:
Fluidität gepackter Erythrozyten, Hct. 95 %, 37 °C

höher als der wirkliche ist, daß Plasma zwischen den weniger verformbaren Erythrozyten eingeschlossen ist. Somit wären also die mittels der Mikrohämatokritzentrifuge eingestellten Werte nach oben verfälscht und somit - bei der starken Hämatokritabhängigkeit der Viskosität von Zellbrei - die wahre Zellbreiviskosität höher. Auf der anderen Seite ist aus Untersuchungen an Menschenerythrozyten bekannt, daß die Viskosität von Zellbrei außerordentlich stark ansteigt, wenn die Verformbarkeit der Zelle abnimmt. Die in Abbildung 13 bis 15 dargestellten Befunde sind daher mit Zurückhaltung zu beurteilen, allerdings ergab sich für uns aus diversen technischen Gründen keine Möglichkeit, diese Messungen zu verbessern.

Alle in Abbildung 16 gezeigten Spezies zeigen eine Zunahme der Fluidität mit zunehmender Schubspannung im Bereich zwischen 5 und 120 dyn/cm². Eine bemerkenswerte Ausnahme machen die Rindererythrozyten. Wie in Abbildung 17 noch einmal gesondert dargestellt, ist das Fluiditätsprofil für Rindererythrozyten gekrümmt, ein Befund, der darauf hinweist, daß die Strömungsanpassung von Rindererythrozyten unter den Bedingungen des Strömens in dicht gepackten Suspensionen oberhalb einer Schubspannung von etwa 60 dyn/cm² nicht mehr weiter zunimmt. Ein Grund für diese bemerkenswerte Tatsache, die sich auch bei 4 Wiederholungen in jeder einzelnen Probe bestätigte, konnte durch die gegenwärtigen Untersuchungen nicht erbracht werden. Siehe auch Unterschiede in der Verformbarkeit in hochviskösen Medien (S. 40).

3.1.5. Diskussion der Viskosimetrie

Die Ergebnisse der Viskosimetrie an heterogenen Flüssigkeiten, wie z.B. Blut, in den sich die Natur der suspendierten Phase als Funktion der einwirkenden Kräfte verändert, sind schwer zu deuten. Man muß davon ausgehen, daß die vorgegebenen Schergrade und die gemessenen Schubspannungen und daraus errechneten scheinbaren Viskositätswerte nur Mittel-

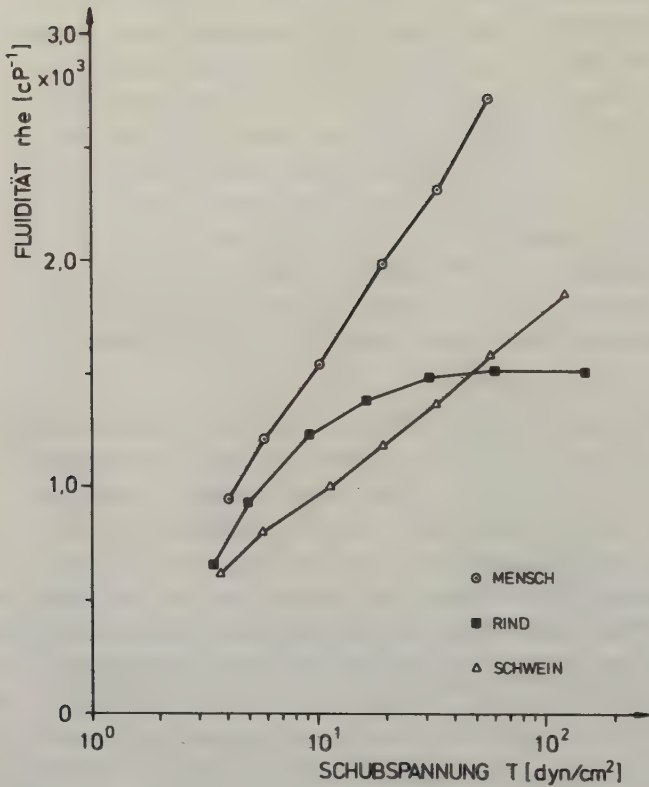


Abb. 17: Fluiditätsprofile gepackter Erythrozyten
Hct. 95 %, 37 ° C

werte sind, die innerhalb der Blutprobe erheblich davon abweichen können. Dies ist umsomehr anzunehmen, wenn Entmischungsvorgänge zu einer Trennung des dünnflüssigen Plasmas von mehr oder weniger dickflüssigen oder festen Erythrozytenaggregaten führt. Außerdem könne sich die genannten Größen als Funktion der Zeit ändern, wenn nach einer Mischungsperiode (wie sie jeweils vor einer Viskosimetrie eingefügt

wird) die Aggregation bzw. Deformation oder die Sedimentation bis zu einem Gleichgewicht abläuft das vom Schergrad abhängt. Die Größe, die letztlich gemessen wird, hängt davon ab, was (Blutbestandteil), wo (in der Meßkammer), wie (lok. Scherbedingungen) gesichert wird u. welche Kräfte durch das Meßgut auf das Meßgerät übertragen werden. Die Kraftübertragung geschieht letztlich immer über eine Plasmaschicht an der Oberfläche des Meßgerätes, denn höchstwahrscheinlich haften die Erythrozyten selbst nicht an der Wand. Dies ist auch der Grund dafür, daß es nicht möglich ist, den Fließpunkt von Blut festzustellen; selbst, wenn alle Erythrozyten in einer Blutprobe miteinander in einem einzigen Aggregat vernetzt sind und dieses dann die Eigenschaften eines Festkörpers aufweist, wird immer eine Schicht Plasma zwischen Erythrozytenaggregat und kraftaufnehmender Oberfläche des Meßgerätes in Scherung versetzt. Soweit heute bekannt ist, hat Plasma selbst keinen Fließpunkt, ja es scheint eine Newton'sche Flüssigkeit zu sein. Exakt deutbare Ergebnisse liefert die Viskosimetrie dann, wenn man homogene Flüssigkeiten mißt, wie z.B. Plasma oder die aus den Erythrozyten gewonnene Hämoglobininlösung. An komplexen Flüssigkeiten können die gemessenen Werte der scheinbaren Viskosität sehr viel sicherer interpretiert werden, wenn das mikroskopische Strömungsverhalten der Bestandteile des Blutes zusätzlich analysiert wird. Daher kommt den Befunden bei der Beobachtung des strömenden Blutes im Rheoskop eine besondere Bedeutung zu.

3.2. Mikroskopische Beobachtung von Erythrozyten in viskosimetrischer Strömung (Rheoskopie)

Bereits in früheren Untersuchungen (16/17/22/26/41/42/44/54/55/56/57/58/60/61/63/64/68) war festgestellt worden, daß das Strömungsverhalten von Suspensionen menschlicher Erythrozyten im wesentlichen bestimmt wird durch deren Aggregation bei niedrigen und deren Deformation und Ausrichtung bei hohen Schergraden. Wurden menschliche Erythrozyten künstlich fixiert, so zeigten sie keines der beiden Phäno-

mene; die Viskosität solcher Suspensionen zeigte auch keine Abhängigkeit vom Schergrad.

Rindererythrozyten, die nach sorgfältiger Waschung in isotonischer Kochsalzlösung durch isotonische Glutaraldehydlösung fixiert wurden und anschließend erneut gewaschen wurden, zeigen in der Strömung ein sehr monotones Verhalten. Unabhängig von der Strömungsgeschwindigkeit überschlagen sie sich dauernd in der Strömung, sie werden weder aggregiert noch verformt. Wie bereits an anderer Stelle mitgeteilt, zeigen Suspensionen solcher künstlich gehärteter Zellen weder in isotoner Kochsalzlösung noch im Plasma eine Schergradabhängigkeit der Viskosität (61/69).

Ein ähnliches Verhalten wurde auch schon für andere monodisperse Suspensionen rigider Partikel nachgewiesen.

Normale Rindererythrozyten im Plasma zeigen dagegen bei Strömung in Plasma bei Schubspannungen oberhalb von 10 dyn/cm^2 eine eindeutige Ausrichtung, sie werden in Ellipsoide deformiert, deren Hauptachse parallel zur Strömungsrichtung orientiert ist. Als Begleiterscheinung dieser Orientierung läßt sich eine kontinuierliche panzerkettenähnliche Rotation der Erythrozytenmembran um den Zellinhalt beobachten, bei welchem die Erythrozytenmembran ähnlich wie ein Transmissionsriemen um den Zellinhalt fährt und in ihm eine intrazelluläre Strömung der Hämoglobininlösung induziert (siehe unten). Bei Schergraden unterhalb von 1 dyn/cm^2 sind die Rindererythrozyten bikonkav, sie rotieren ständig in der Strömung und verhalten sich ganz ähnlich wie Festkörper. Die Orientierung, Deformation und Membranrotation der Erythrozyten, wie die bei Schergradspannung zwischen 1 und 10 dyn/cm^2 im Rheoskop beobachtbar ist, korreliert mit der Abnahme der scheinbaren Viskosität im gleichen Schubspannungsbereich wie er an Suspensionen solcher Zellen im Rotationsviskosimeter nachweisbar ist.

Alle Erythrozytensuspensionen, die schwach ausgeprägte Erythrozytenaggregation aufweisen, zeigen ebenfalls bei hohen Schergraden die geschilderte Deformation, Orientierung und

Rotation. Bei niedrigen Schergraden (unter 20 sec^{-1} oder 0.1 dyn/cm^2) sind hier allerdings die Erythrozyten in kurze, diskontinuierliche Geldrollen und Klumpen von Geldrollen vereinigt. Diese sind voll reversibel und werden bei Erhöhung des Schergrades sofort dispergiert, um bei Erniedrigung dann wieder zu erscheinen. Die beiden Vorgänge der Aggregatdispersion und der Erythrozyten-deformation lassen sich weder zeitlich noch räumlich klar voneinander trennen, sondern geschehen simultan und abwechselnd: im Rheoskop lassen sich bei einem Schergradbereich zwischen 2 und 20 dyn/cm^2 sowohl einzelne unverformte als auch verformte Erythrozyten und daneben kleine Erythrozytenaggregate feststellen.

Mit Ausnahme des Rindes und des Truthahns zeigten alle untersuchten Tierspezies bei Schergraden unter 5 sec^{-1} die Anwesenheit von Erythrozytenaggregaten, alle Blutproben außer Truthahn zeigen Erythrozytendeformationen bei hohen Schergraden. Der Übergang der beiden mikrorheologischen Zustände der Erythrozyten ist jedoch den viskosimetrischen Daten nicht eindeutig entnehmbar. Zwar zeigten die stark aggregierenden Spezies, Hund, Schwein, Pferd und auch Mensch die ausgeprägteste Schergradabhängigkeit der scheinbaren Blutviskosität, wohingegen das Blut von Hamstern, Meerschweinchen und Kaninchen die geringste Abhängigkeit aufwiesen. Das Blut der Ratte mit ihrer vergleichsweise schwachen Aggregation und das der Katze mit ihrer verhältnismäßig starken Aggregation waren jedoch in ihren viskosimetrischen Verhalten auffallend ähnlich.

Eine Besonderheit zeigt das Blut von Pferden. Wie weiter unten gezeigt werden wird, liegt bei dieser Tierspezies eine besonders scherrestistente, d.h. auch bei hohen Schergraden bestehende Erythrozytenaggregation vor. Diesem Be-

fund entspricht die Tatsache, daß die Blutviskosität auch noch bei Steigerung der Schubspannung bis 10 dyn/cm^2 deutlich, während sie bei den meisten anderen Spezies ^{abnimmt} in viel geringerem Maße absinkt, bzw. sich schon einem Grenzwert nähert. Diese Tatsache ist wie folgt zu deuten: bei dieser Tierspezies bestehen Aggregate auch noch im Bereich hoher Schubspannungen und nehmen bei Steigerung derselben an Größe ab und reduzieren so deren hydrodynamische Effekte.

Für menschliches Blut wurde bereits nachgewiesen, daß die Erythrozytenaggregation von der Anwesenheit bestimmter Plasmaproteine vor allem des Fibrinogens abhängt. Bei Defibrinierung des Blutes, bzw. Suspension von Erythrozyten in Serum fehlt deswegen sowohl die Aggregation als auch die starke Schergradabhängigkeit der Viskosität. Dieser Befund wurde außer an Erythrozytensuspensionen in Serum von Hund, Katze, Schwein und Pferd im jeweils homologen Serum bestätigt (keine Abbildung).

So bestätigen zwar alle diese Befunde die am Menschenblut erhobene Theorie, nachdem das Nicht-Newton'sche Verhalten der Blutviskosität durch schergradabhängige Aggregation, Verformung und Ausrichtung der Erythrozyten bedingt ist, sie zeigen jedoch gleichzeitig wie schwierig es ist, diese wichtigen hämodynamischen Faktoren mit Hilfe der Rotationsviskosimetrie quantitativ zu erfassen. Dies hat eine Reihe von Gründen:

1. Aggregate und Einzelerythrozyten kommen in einem weitem Bereich von Schergraden nebeneinander vor, sie beeinflussen die scheinbare Viskosität jedoch in verschiedenem Maße.
2. Blut entmischt sich zeitabhängig nach Übergang von einem hohen in einen niedrigen Schergrad. Das Ausmaß und der Zeitverlauf der Entmischung ist sehr variabel. Aus technischen Gründen muß man, besonders bei den niedrigen Schergraden, bei denen die Aggregate existenzfähig sind, lange Zeit warten, ehe sich ein "verwertbarer" Schubspannungswert für den vorgegebenen Schergrad einstellt. Entsprechend unsicher ist der daraus errechnete Wert der

scheinbaren Viskosität.

Es gibt bei den verschiedenen Spezies qualitativ wie quantitativ verschiedene Formen der Aggregate. Zwar finden sich bei den meisten Spezies Primäraggregate in Form der sogenannten Geldrollen (Rouleaux), jedoch die Sekundäraggregation, d.h. die Vernetzung der Rouleaux untereinander, sind sehr variabel. Hierbei muß besonders unterschieden werden zwischen den sogenannten Netzaggregaten, d.h. solchen Aggregaten, in denen die Rouleaux eine dreidimensionale Struktur bilden, welche verhältnismäßig große Mengen des Plasmas innerhalb der Struktur immobilisieren (Abb. 31). Davon abzutrennen sind sogenannte "Klumpenaggregate", bei denen die Geldrollen durch Seit-zu-Seit-Apposition dichte Klumpen bilden, innerhalb derer wenig Plasma immobilisiert wird, zwischen denen jedoch große zellfreie Plasmalücken entstehen (Abb. 33,34). Die Unterschiede zwischen der sogenannten Klumpenaggregation und der Netzaggregation werden im folgenden näher beschrieben werden: die ersteren bilden sich vorwiegend bei Pferd, Schwein, Hund (Abb. 33) oder Katze (Abb. 34), während sich Netzaggregate bei Ratte (Abb. 31), gesunden Menschen, Hammel, Meerschweinchen, Goldhamster und Kaninchen fanden.

Diese beiden Typen der Aggregation haben besonders bei niedrigen Schergraden (1 bis 10 sec^{-1}) ein quantitativ wie qualitativ unterschiedliches Verhalten, und es muß davon ausgegangen werden, daß sie auch in unterschiedlicherweise die Transmission von Schubspannung und damit den gemessenen Wert der scheinbaren Blutviskosität beeinflussen. Quantitative Untersuchungen zum Einfluß des Typs der Aggregation auf die scheinbare Viskosität liegen allerdings bis heute noch nicht vor.

3.3. Filtration von Erythrozytensuspensionen durch Poren von 5 μm Durchmesser

Durch die Bestimmung der relativen Flußrate, d.h. dem Quotienten aus der Flußrate einer Erythrozytensuspension mit Hämatokrit 10 % und ($\dot{V}_{\text{susp}}$) und der Flußrate des Plasmas ($\dot{V}_{\text{Pl}}$) läßt sich ein Maß für die Verformbarkeit der Erythrozyten numerisch ausdrücken. Unabhängig von den Speziesunterschieden in der Erythrozytengröße verwendeten wir einheitliche Poren von 5 μm Durchmesser und maßen den Fluß der Erythrozyten unter einer einheitlichen Druckdifferenz von 50 mm H_2O . Daraus ergibt sich die Wandschubspannung (τ_w) und errechnet sich nach folgender Formel:

$$\tau_w = \frac{\Delta P \cdot r}{2 l}$$

ΔP	= Druckdifferenz	50 mm H_2O
r	= Porenradius	2,5 μm
l	= Porenlänge	11 μm

Es ergibt sich ein Wert von 542 dyn/cm^2 , was größenordnungsmäßig den in vivo maximal vorkommenden Werten entsprechen dürfte (23/65).

Die Tabelle 2 zeigt den Mittelwert und die Standardabweichung der relativen Flußraten der verschiedenen Spezies, ferner den maximalen Durchmesser der Erythrozyten in μm . Jede Zahl gibt den Mittelwert und die Standardabweichung aus mindestens 21 Messungen wieder. Auffallend ist die Tatsache, daß unter den gegebenen Bedingungen die menschlichen Erythrozyten eindeutig am besten verformbar waren, obwohl ihr Durchmesser ebenso groß oder größer ist als die der anderen Spezies.

Bei der Beurteilung dieser Daten muß allerdings die Tatsache mit berücksichtigt werden, daß vor der Messung der Zellverformbarkeit in dem hier verwendeten Filtrationsapparat umfangreiche Vorbereitungsarbeiten notwendig sind und in der Regel mikroskopisch sichtbare Veränderungen in

der Ruheform der Erythrozyten auftraten (Stechapfelbildung etc.). Desungeachtet waren jedoch die Erythrozyten aller Spezies in der Lage, Poren zu passieren, die im Mittel nur 2/3 des größten Durchmessers der Zellen in Ruhe aufwiesen.

Tabelle II

Relative Flußraten von Erythrozyten in Plasma, Hct. 10 %
durch 5 μm Poren, 50 mm H_2O , 37 ° C

	$\dot{V}$ rel.	$\overline{\text{max. Ery } \varnothing}$ (μm)
Mensch	0.68 $\pm$ 0.06	7,5
Rind	0.60 $\pm$ 0.12	5,9
Schwein	0.52 $\pm$ 0.14	6,9
Kaninchen	0.49 $\pm$ 0.13	7,5
Meerschw.	0.45 $\pm$ 0.07	7,4
Goldhamster	0.42 $\pm$ 0.07	5,6
Ratte	0.41 $\pm$ 0.05	7,5
Hund	0.39 $\pm$ 0.11	7,0
Katze	0.36 $\pm$ 0.14	6,0

Die Fähigkeit der Erythrozyten sich bei Passage durch enge Poren zu verformen hängt von einer Reihe von Faktoren ab: Dazu gehören Volumen, Oberflächen-Volumenverhältnis, mechanische Eigenschaften der Membran, Viskosität des löslichen und mechanische Eigenschaften des unlöslichen Erythrozyteninhalts sowie eventuelle Aggregationstendenzen.

Die meisten dieser Parameter sind miteinander gekoppelt. In dem hier verwendeten Mikrozirkulationsmodell ist es möglich, eine Art "mittlere Verformbarkeit" der Gesamtpopulation aller Erythrozyten zu messen, eine Größe, die letztlich auch in vivo entscheidend ist. Es ist aber nicht möglich, den Einfluß eines einzelnen Parameters auf die Verformbarkeit genauer festzulegen, da sich vermutlich immer mehrere Parameter gleichzeitig ändern. So ist es nicht zu erwarten, daß die Abhängigkeit der "mittleren Verformbarkeit" vom Filtrationsdruck für alle Spezies gleich ist. Diese Behauptung stützt sich auf die Untersuchungen über die Fluidität gepackter Erythrozyten-suspensionen (siehe Seite 31) und die Messung der Verformung von Erythrozyten bei Strömung in hochviskösen Medien (siehe Seite 65). Daher ergibt sich die Forderung, in Zukunft besser eine Art Verformbarkeitsprofil analog den Viskositätsprofilen als Funktion der treibenden Drucke zu bestimmen.

Dazu eignet sich die bisher verwandte Methode nur bedingt: schon bei einem Druck von 50 mm H₂O und einer Wandschubspannung von etwa 542 dyn/cm² ist sie mit erheblichen Fehlern behaftet, welche bei Senkung des treibenden Druckes nur noch weiter zunehmen. Vor allem muß vermutet werden, daß die Flußbedingungen NICHT KONSTANT sind, da Porendurchmesser und Porenanzahl in den verschiedenen Filtern nicht konstant sind (65) und außerdem angenommen werden muß, daß die Zahl der Poren durch Blockierung während der Messung unkontrollierbar kleiner werden kann.

Ein wesentlicher Fortschritt gegenüber der hier verwendeten Methode ist die in unserem Labor entwickelte Bestimmung der Passagezeit einzelner Erythrozyten durch eine einzige Pore unter mikroskopischer Kontrolle (53). Hierbei fallen die oben angedeuteten Fehlermöglichkeiten

weg, ferner kann die Variabilität der Verformbarkeit innerhalb der gemessenen Erythrozytenpopulation erfaßt werden.

Es muß weiteren Untersuchungen mit dieser Methode vorbehalten werden, die Frage zu klären, inwieweit die immer wieder beobachtete Stechapfelbildung (Abb. 32) bei dem Blut der meisten Tierspezies die niedrigen Flußraten erklärt. Ferner bleibt zu klären, ob nicht vielleicht die Stechapfelbildung bei niedrigeren Perfusionsdrucken einen wesentlich höheren Effekt haben könnte, was zumindesten theoretisch plausibel wäre. Zum Beispiel ließe sich dann auch die Frage klären, inwieweit die zum mindesten für die Ratte beschriebene Veränderung des Hämoglobins in einen parakristallinen Zustand (49) Einfluß auf die Verformbarkeit haben könnte. Hierzu müßten dann vorteilhafterweise die Messung der Einzelzellverformbarkeit mit einer Messung der Zellbreifluidität unter genau definierten Hämatokritbedingungen kombiniert werden.

3.4. Aggregometrie durch Messung der Lichttransmission

Sowohl die Ausrichtung der Erythrozyten in schneller Strömung als auch deren Zusammenlagerung in große Aggregate mit Bildung zellfreier Plasmalücken haben einen starken Einfluß auf die Lichttransmission, eine Tatsache, die schon verschiedentlich zur quantitativen Aggregometrie ausgenutzt wurde. Wenngleich viele Einzelheiten des quantitativen Zusammenhangs zwischen mikrorheologischen Verhalten und Lichttransmission bzw. Lichtstreuung noch zu klären sind (siehe auch Seite 61), so erlaubt die Methode doch schon jetzt eindeutig die Korrelation von mikrorheologischen Verhalten, einwirkenden Kräften, bzw. Geschwindigkeit von Veränderungen im rheologischen Verhalten. Wie an anderer Stelle ausführlich beschrieben (44/64/68/69/70/71) lassen sich die folgenden Größen registrieren:

1. Bestimmung des Schergrades, bei dem die Blutprobe die geringste Lichttransmission aufweist $\dot{\gamma}_{\tau_{\min}}^{-1}$ (sec^{-1}) (44/64). Dieser Schergrad ist umso höher, je höher die mittlere Adhäsivität der Erythrozyten und ist damit ein Maß für die Kräfte, die notwendig sind, um die Erythrozyten in Strömung an der Aggregation zu hindern.
2. Es kann festgestellt werden, ob langsame Strömung die Aggregate dispergiert, bzw. sie induziert. Zu diesem Zweck wird bei langsamer Scherung (7 bis $12,5 \text{ sec}^{-1}$) der sogenannte FSAR-Quotient (64/68) gemessen, welcher sich aus dem Quotienten von der Lichttransmission nach 1 Minute der Stase und der Lichttransmission nach 1 Minute langsamer Strömung bildet (FSAR = Flow to Stasis Aggregation Ratio). Die Bestimmung dieser Größe ist allerdings nur dann sinnvoll, wenn der $\dot{\gamma}_{T_{\min}}^{-1}$ deutlich höher liegt als $12,5 \text{ sec}^{-1}$.
3. Die Bestimmung der Halbwertszeit ($t_{1/2}$) des Vorgangs der Aggregatbildung, gemessen während Stase nach schneller Scherung (d.h. hydrodynamischer Dispersion der Aggregate). Die Auswertung der photometrischen Registrierung erfolgte durch graphische Bestimmung der Geschwindigkeiten, mit welcher, während der Aggregation, die Lichttransmission zunimmt (70/71). Die Geschwindigkeit dieser Lichtzunahme fällt annähernd exponentiell ab und erlaubt somit durch halblogarithmische Darstellung die Bestimmung einer Halbwertszeit, bzw. einer Zeitkonstante dieses Prozesses.

3.4.1. Korrelation von mikrorheologischem Verhalten mit der Lichttransmission von kleinen Blutproben im Rheoskop

In der von Klose (44/64) beschriebenen makroskopischen Platte-Kegelkammer wurde bereits früher die Abhängigkeit zwischen Lichttransmission und mikrorheologischem Verhalten auf Grund von Experimenten belegt, bei denen mit menschlichen Erythrozyten die Aggregation entweder normal be-

lassen, gesteigert oder aufgehoben wurde. In den weiter unten zu beschreibenden Experimenten, in welchen Tierspezies mit spontan sehr unterschiedlichem Aggregationsverhalten verglichen werden, soll die früher aufgestellte Korrelation weiter untersucht werden.

Rinderblut

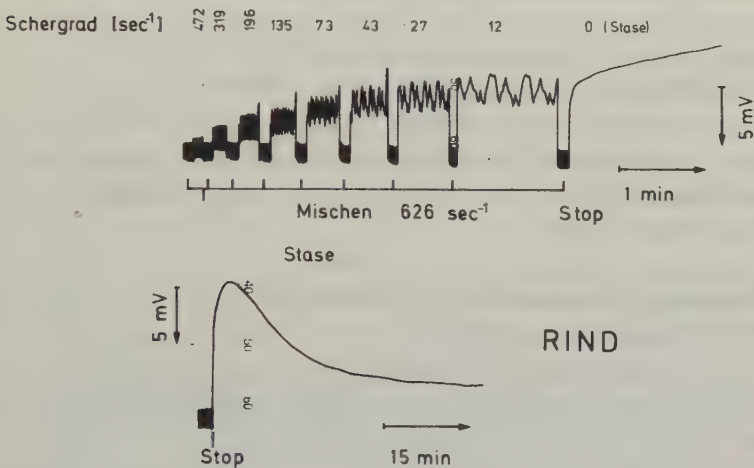


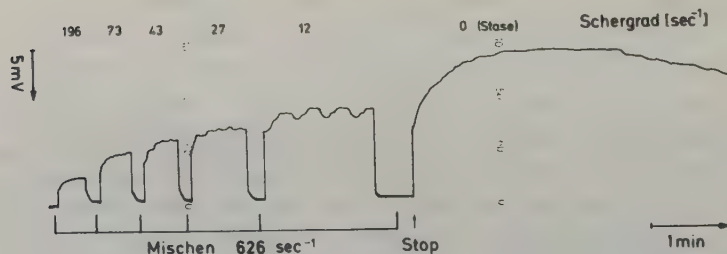
Abb. 18: Originalregistrierung der Lichttransmission von Rinderblut in viskometrischer Strömung, Hct. 33 %, 23°C. Lichttransmission, dargestellt als Spannung der Photozelle, bei verschiedenen Schergraden und bei Strömungsstillstand. Zwischen jeweils zwei Schergraden wird durch schnelle Strömung (626 sec^{-1}) die Probe gemischt.

Wie seit langem bekannt, sind Rindererythrozyten nicht in der Lage, Erythrozytenaggregate zu bilden, sie richten sich jedoch, wie eindeutig im Rheoskop zu beobachten bei hoher Strömung in derselben aus und werden ständig zu unregelmäßigen Ellipsoiden verformt. Bei langsamer Scherung imponieren die Erythrozyten als einzelne bikonkave Scheibchen, die sich langsam in der Strömung drehen, bei längerer Stase kann man ihre Sedimentation beobachten.

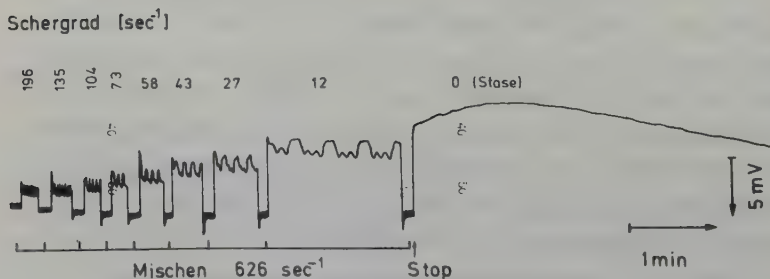
Die höchste Lichttransmission war zu beobachten bei 626 sec^{-1} , sie nimmt bis etwa 12 sec^{-1} mit abnehmendem Schergrad ab und bleibt dann bis $1,25 \text{ sec}^{-1}$ gleich (Abb.18).

Die Photospannung der Selenzelle wurde bei verschiedenen auf das Blut einwirkenden Schergraden registriert. Diese Abbildung zeigt auch, daß in Stase, d.h. bei Stop der Strömung die Lichttransmission am geringsten ist. Während des Übergangs von schneller Scherung (626 sec^{-1}) auf Stop nimmt die Lichttransmission zunächst schnell ab und dann langsamer, erst nach 2 Minuten beginnt ein langsamer aber lang anhaltender Anstieg der Lichttransmission (siehe unteren Teil der Abbildung), der im Verlauf von 15 Minuten die Lichttransmission deutlich ansteigen läßt. Dieser Anstieg ist jedoch nicht mit der Bildung irgendwelcher mikroskopisch erkennbarer Aggregate erklärbar, seine Ursache bedarf weiterer Klärung, sie dürfte mit der Sedimentation zusammenhängen.

Goldhamster, Meerschweinchen, Kaninchen



GOLDHAMSTER



MEERSCHWEINCHEN

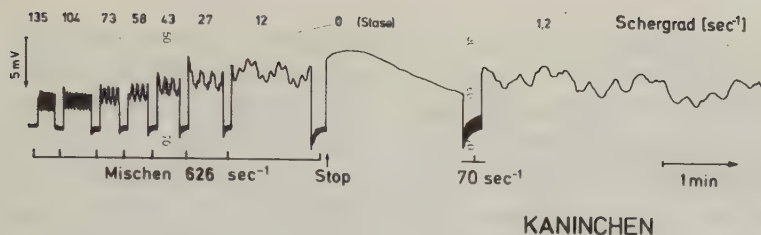


Abb. 19: Originalregistrierung der Lichttransmission von Goldhamster, Meerschweinchen und Kaninchenblut, Hct. 33 %, 23 °C (s. Legende Abb.18)

Bei allen drei Spezies sind die Erythrozyten bei höherem Schergraden verformt und ausgerichtet (Abb. 35), erst bei sehr niedrigen Schergraden, d.h. unterhalb von 3 sec^{-1} erkennt man eindeutig kurze Geldrollen und Aggregate derselben, die beim Hamster aus 2 - 3 und beim Kaninchen und Meerschweinchen aus 3 - 5 Erythrozyten bestehen. In Stase bilden sich dann bei allen drei Spezies größere Strukturen von Aggregaten aus, bei denen jedoch noch sehr viele einzelne Erythrozyten verbleiben. Beim Blut dieser drei Spezies nimmt die Lichttransmission mit fallendem Schergrad ab. Beim Meerschweinchen und Kaninchen erreicht die Lichttransmission etwa bei 3 sec^{-1} ihr Minimum ($\dot{\gamma}_{T_{\min}} = 3 \text{ sec}^{-1}$) und steigt bei niedrigeren Schergraden wieder geringfügig an. Beim Hamster dagegen fand sich nur bei 2 von 8 Blutproben ein solcher sekundärer Lichttransmissionsanstieg.

Beim Übergang von schneller Strömung zu Stase kam es bei allen drei Spezies initial zu einem schnellen, danach langsamen Abfall der Lichttransmission, dann jedoch innerhalb der nächsten 20 - 180 sec zu einem spontanen Transmissionsanstieg. In allen drei Spezies ist dieser auch mit der oben beschriebenen schwachen Aggregatbildung korreliert.

Ratte

Das Aggregationsverhalten und die Lichttransmission des Rattenblutes ist sehr stark abhängig von der Ruheform der Erythrozyten. Solange die Erythrozyten in Ruhe ihre bikon-

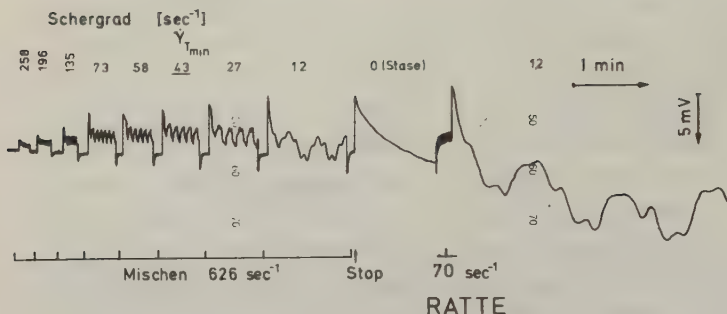


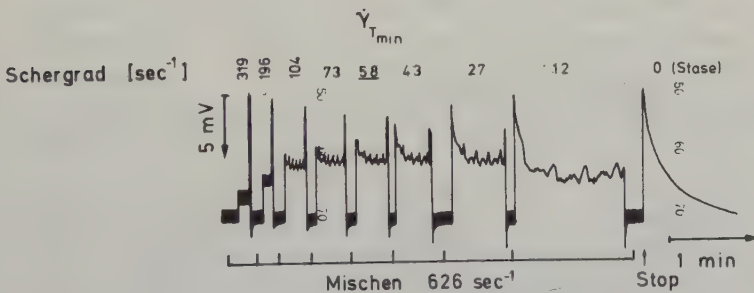
Abb. 20: Originalregistrierung der Lichttransmission von Rattenblut, Hct. 33 %, 23 °C (siehe Legende Abb. 18). Der Schergrad der minimalen Lichttransmission ist unterstrichen ($\dot{\gamma}_{T_{\min}}$, s.S. 42).

kave Form haben (Abb. 31), d.h. nicht in die Stechapfelform übergegangen sind, zeigt sich bei hohen Schergraden Ausrichtung (Abb. 32), bei Schergraden unterhalb von etwa 30 - 40 sec^{-1} typische Aggregatbildung in Geldrollen und Sekundäraggregate. In solchen (frischen !) Blutproben fällt dann die Lichttransmission auch bei Schergraden zwischen 626 und 43 sec^{-1} (Abb. 20) ab, um dann bei tieferen Schergraden (27, 12 und 1,2 sec^{-1}) wieder zuzunehmen. Frisches Rattenblut zeigt also ein biphasisches Verhalten der Lichttransmission als Funktion fallender Schergrade. Dieses Verhalten ähnelt dem, was bereits früher für Menschenblut beschrieben wurde (44/64).

Sobald die Erythrozyten zu Stechapfelzellen geworden sind, findet praktisch keine Erythrozytenaggregation mehr statt. Die Zellen kleben nur noch ganz schwach mit den Zellfortsätzen (Stacheln) aneinander und werden durch hydrodynamische Kräfte sehr leicht dispergiert. Dementsprechend können sich bei auch sehr langsamer Strömung keine Aggregate mehr halten, die Lichttransmission fällt dann kontinuierlich mit fallendem Schergrad zwischen 626 und 1,2 sec^{-1} ab.

Auch die Lichttransmission in Stase, bzw. der Zeitverlauf ihrer Zunahme bei Rattenblut ist sehr stark abhängig von der Stechapfelbildung. Bei frischem Blut nimmt in Stase die Lichttransmission stark ab, um dann schnell wieder zuzunehmen. Bei Stechapfelzellen nimmt in Stase die Lichttransmission lediglich schnell ab, zeigt jedoch nicht die sekundäre Zunahme. Die Messung der Lichttransmission in Stase erweist sich somit als ein sehr empfindliches Maß für die Fähigkeit der Erythrozytenaggregate zu bilden. Bei Untersuchung dieser Art zeigt sich allerdings auch, daß die spontane Stechapfelbildung den Prozess der Aggregation sehr viel mehr beeinflusst als die Deformierbarkeit (s. S.28f). Auch Blutproben, bei denen bereits die Aggregation völlig aufgehoben war, zeigten gute Verformung und Ausrichtungen der Zellen in schneller Strömung. Das gleiche gilt auch für spontan entstandene Stechapfelzellen vom Goldhamster, Meerschweinchen und Kaninchen (nicht jedoch beim Schwein).

Mensch



MENSCH

Abb. 21: Originalregistrierung der Lichttransmission von Menschenblut, Hct. 33 %, 23 °C (s. Legende Abb. 18)

Bei menschlichen Erythrozyten zeigte sich immer wieder die Verformung und Ausrichtung bei Schergraden zwischen 100 und

600 sec^{-1} und Aggregation bei Schergraden unterhalb von etwa 80 sec^{-1} . Dementsprechend zeigte sich im Rheoskop, analog zu der von KLOSE beschriebenen makroskopischen Strömungskammer, eine Abnahme der Lichttransmission bei fallendem Schergrad zwischen 626 und 80 sec^{-1} und eine Zunahme bei niedrigeren Schergraden.

Bei Übergang von schneller Strömung auf Stase steigt die Lichttransmission nach dem initialen Abfall zunächst steil und dann langsam an. Beim Blut gesunder Versuchspersonen zeigte sich stets nach 1 Minute Stase die höchste Lichttransmission und die kräftigste Aggregation. Bei langsamer Strömung (bei $12,5 \text{ sec}^{-1}$) waren die Aggregate teilweise dispergiert und die Lichttransmission geringer als in Stase (Abbildung 21). Dementsprechend errechnete sich ein FSAR Quotient kleiner als 1.0.

Hund

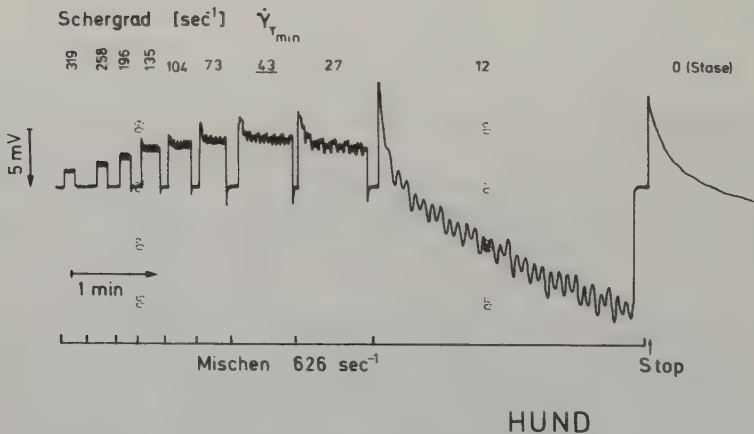


Abb. 22: Originalregistrierung der Lichttransmission von Hundeblut, Hct. 33 %, 23°C (s. Legende Abb. 18)

Auch Hundeblut zeigte grundsätzlich Aggregation bei niedrigen Schergraden, wobei jedoch Ausmaß und Scherungsresistenz der Aggregate vom Individuum zu Individuum stark schwankte. Sehr häufig zeigte sich bei dieser Spezies das Phänomen der sogenannten Klumpenaggregation: d.h. die Erythrozyten klebten mit allen Membranflächen aneinander, was dadurch zustande kam, daß sich die Primärrouleaux durch Seit-zu-Seit-Apposition in großen Klumpen aneinanderlagern. Diese großen Klumpen ließen zwischen sich große Lücken zellfreien Plasmas und hatten die Tendenz, in langsamer Strömung zu rotieren. Während dieser Rotation kollidieren die Aggregate miteinander und der Vorgang der Aggregation überwiegt dann dem der Dispersion. Infolgedessen nimmt die mittlere Größe dieser Klumpenaggregate mit der Zeit zu (Abb. 33).

Bei hohen Schergraden lassen sich diese Aggregate fast vollständig dispergieren, allerdings zeigt die Analyse der Mikrophotogramme, daß auch bei einem Schergrad über 300 sec^{-1} noch gelegentlich kleine Aggregate aus 2-3 Erythrozyten bestehen. Bringt man jetzt die Strömung zum Stillstand, dann bilden sich sofort größere Netzaggregate mit Plasmalücken innerhalb, aber nicht zwischen den Aggregaten aus. Der Vorgang der Klumpenaggregation ist also an das Vorhandensein langsamer Strömung gebunden.

Die photometrische Registrierung (Abb.22) zeigt auch beim Hundeblut den typischen biphasischen Verlauf, ähnlich wie beim Menschenblut. Der Schergrad der minimalen Lichttransmission schwankt aber in weiten Grenzen. Die Mehrzahl der Hundeblutproben zeigte bei einem Schergrad von 12 sec^{-1} keinen konstanten Lichttransmissionswert, sondern derselbe stieg fortlaufend über längere Zeit an und erreicht dann nach 1 Minute einen deutlich höheren Wert als die Lichttransmission in Stase nach 1 Minute. Dementsprechend ist der FSAR-Quotient größer als 1. Einige Hunde zeigten allerdings weder

die oben beschriebene Klumpenaggregation noch den fortlaufenden Anstieg der Lichttransmission und hatten dementsprechend einen FSAR-Quotienten kleiner als 1.0.

Katze

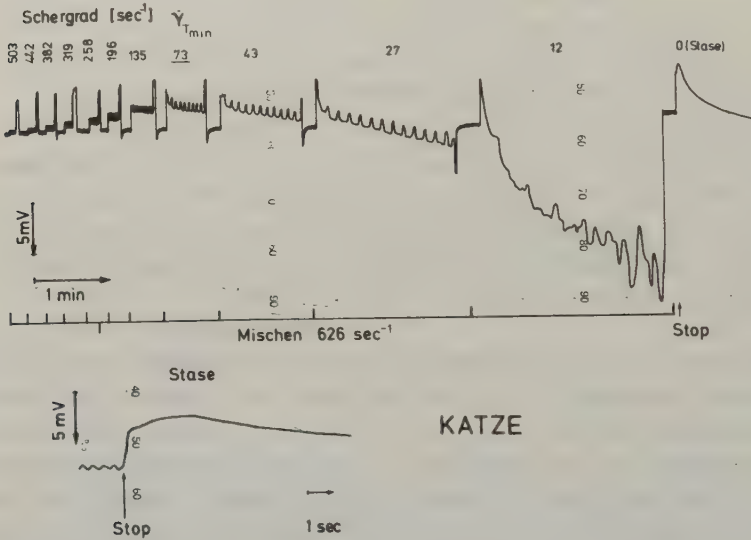


Abb. 23: Originalregistrierung der Lichttransmission von Katzenblut, Hct. 33 %, 23 °C.
(s. Legende Abb. 18)

Auch bei Katzenblut zeigt sich die oben beschriebene Klumpenaggregation, die in fast allen Einzelheiten derjenigen des Hundeblutes glich. Allerdings zeigte sich gelegentlich, daß einzelne Erythrozyten spindelartig zwischen zwei Aggregaten ausgezogen wurden und nur noch einen punktförmigen Kontakt miteinander zu haben scheinen (Abb. 34). Bei hohen Schergraden (oberhalb 300 sec^{-1}) zeigt auch das Blut dieser Spezies Orientierung, Ausrichtung und Verformung der Erythrozyten. Wird jetzt die Blutprobe plötzlich zum Stehen gebracht, bilden

sich wiederum nur Netzaggregate.

Auch bei Katzenblut zeigt sich ein biphasischer Verlauf der Lichttransmission als Funktion des Schergrades. Der Schergrad der minimalen Lichttransmission liegt etwa bei 50 sec^{-1} , bei langsamer Scherung ($12,5 \text{ sec}^{-1}$) kam es sehr häufig zu einem länger anhaltenden Anstieg der Lichttransmission, dementsprechend war der FSAR-Quotient größer als 1.0. Bei plötzlichem Übergang von schneller Strömung auf Stase konnten bei der Lichttransmission sehr viel deutlicher als bei anderen Spezies 3 Phasen unterschieden werden: zunächst fiel die Lichttransmission schnell, dann deutlich davon abgesetzt langsamer ab, ehe sie dann die für die Aggregation typische Sekundärzunahme aufwies. Dieses Phänomen ist besonders gut bei schneller Registrierung der Lichttransmission (unterer Teil der Abbildung 23) feststellbar. Der Grund für die Zwischenschaltung einer Phase langsamer Transmissionsabnahme ist unklar.

Schwein

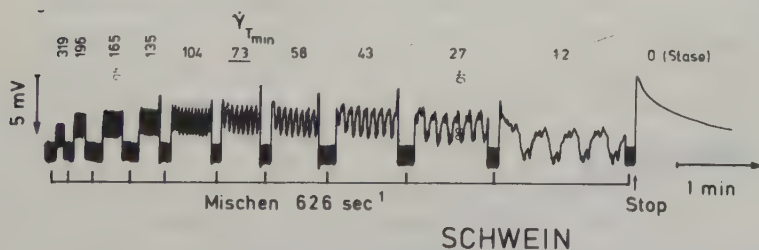


Abb. 24: Originalregistrierung der Lichttransmission von Schweineblut, Hct. 33 %, 23 °C (s. Legende Abb. 18)

Die Erythrozyten des Schweines zeigen insofern morphologische Besonderheiten als bei ihnen die Erythrozyten innerhalb der

Aggregate unregelmäßig verformt sind. In keinem Fall läßt sich eine bikonkave oder sonstige Scheibchenform nachweisen. Vielmehr sind die Erythrozyten wie die Elemente eines sogenannten "Puzzle"-Spiels ineinander verhakt: alle Erythrozyten sind mit ihrer gesamten Oberfläche an dem Aggregationsprozess beteiligt. Diese Verformung der Erythrozyten hat offensichtlich nichts mit Stechapfelformbildung zu tun, da Erythrozyten, die nicht in einem Aggregat immobilisiert sind, eine bikonkave Form aufweisen. Der Grund für die Verformung der Schweineerythrozyten innerhalb eines Aggregats bleibt unklar.

Schweineerythrozyten zeigten stets kräftige Aggregation, in der Regel in Form von Klumpenaggregation, wobei die Größe der Klumpen bei einem Schergrad von $12,5 \text{ sec}^{-1}$ kleiner war als die von Hund und Katze. Dennoch waren die Aggregate nach 1 Minute Strömung deutlich größer als nach 1 Minute Stase; dementsprechend war der FSAR-Quotient geringfügig höher als 1 (im Mittel 1.07).

Pferd

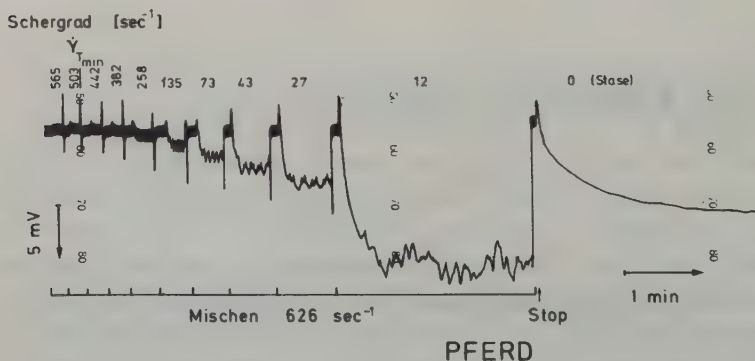


Abb. 25: Originalregistrierung der Lichttransmission von Pferdeblut, Hct. 33 %, 23°C (s. Legende Abb. 18)

Die ausgeprägteste Erythrozytenaggregation, welche gleichzeitig den höchsten Schergraden widersteht, findet sich beim Pferd. Auch diese Aggregation ist allerdings reversibel, wenn gleich bei einem Schergrad von 626 sec^{-1} keineswegs alle Erythrozyten einzeln und orientiert strömen, sondern viele von ihnen noch in kleinen Aggregaten zusammengeballt vorliegen. Die kleinen Aggregate rotieren in der Strömung, was durch ihre nahezu sphärische Form erleichtert wird. Bei Strömung unter niedrigen Schergraden (12 sec^{-1}) bilden sich sehr große Klumpenaggregate aus, die fortlaufend wachsen und dementsprechend große Plasmalücken zwischen sich freilassen. Bei Übergang von schneller Strömung zu Stase bilden sich dagegen netzartig miteinander verbundene Ketten von Geldrollen aus. Hier sind die Plasmalücken in etwa gleichmäßig innerhalb und zwischen den Aggregaten verteilt.

Beim Pferdeblut zeigt sich die geringste Lichttransmission bei einem Schergrad von 626 sec^{-1} . Jede Abnahme des Schergrades ist mit einer Zunahme der Lichttransmission verbunden. Bei Schergraden zwischen 626 und etwa 100 sec^{-1} stellt sich ein für jeden Schergrad charakteristisches Lichttransmissionsniveau ein, bei Schergrad unterhalb von 100 sec^{-1} nimmt dagegen die Lichttransmission progressiv zu. Dies ist am deutlichsten ausgeprägt beim Schergrad von 12 sec^{-1} (Abb. 25). Dementsprechend errechnet sich ein FSAR-Quotient von ca. 1,5.

Bei Suspensionen von gewaschenen Pferdeerythrozyten im homologen Serum kommt es ebenfalls zu sehr ausgeprägter, bei niedrigen Schergraden zu Klumpenaggregation, die aber nicht ganz so stark ist wie bei Plasmasuspensionen.

Truthahn

Die Erythrozyten des Truthahns sind schon in Ruhe Ellipsoide, bei Scherung lagern sich diese Ellipsoide flach zwischen den gescherten Schichten und werden nicht nachweisbar verformt.

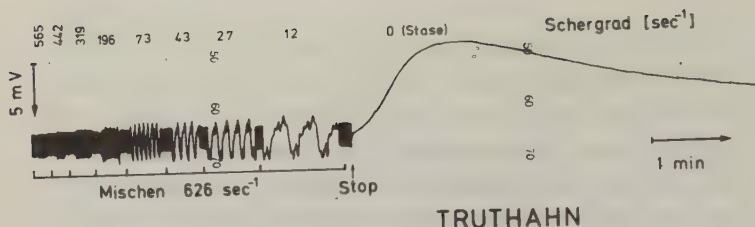


Abb. 26: Originalregistrierung der Lichttransmission vom Truthahnblut, Hct. 33 %, 23 °C (s. Legende Abb. 18)

Bei Strömungsstillstand im Anschluß an eine Scherung verbleiben die Erythrozyten zunächst in dieser ausgerichteten Form, um sich dann ganz allmählich in beliebiger Weise zu orientieren. Erst nach längerer Zeit des Strömungsstillstandes, während der eine Sedimentation dieser Erythrozyten zu beobachten ist, stellt sich ein Teil dieser Zellen so ein, daß ihre Schmalseite nach unten sieht. Bei jeder auch noch so geringen Scherung (12 sec^{-1}) kommt es sofort wieder zur Reorientierung, wobei die Breitseite der Ellipsoide in der Scherungsebene ausgerichtet ist.

Gegenüber dem Ruhezustand, welcher sich jedoch sehr langsam einstellt, steigt die Lichttransmission bei jeder Scherung zwischen 12 und 626 sec^{-1} an, innerhalb dieses Schergradbereichs bleibt die Lichttransmission jedoch im Mittel konstant. Nach Strömungsstillstand kommt es langsam (siehe Abb. 26) innerhalb von 1,5 Minuten zu einer Abnahme der Lichttransmission, dann nach etwa 2 Minuten zu einem noch langsamer folgenden Anstieg der Lichttransmission. Letzterer ist korreliert mit der Sedimentation und Orientierung der Zellen mit ihrer Schmalseite nach unten.

Rindererythrozyten nach Behandlung mit Pronase

Die Speziesbesonderheit der Rinder in ihrem nativen Plasma keine Geldrollen und sekundäre Aggregate zu bilden, ist schon

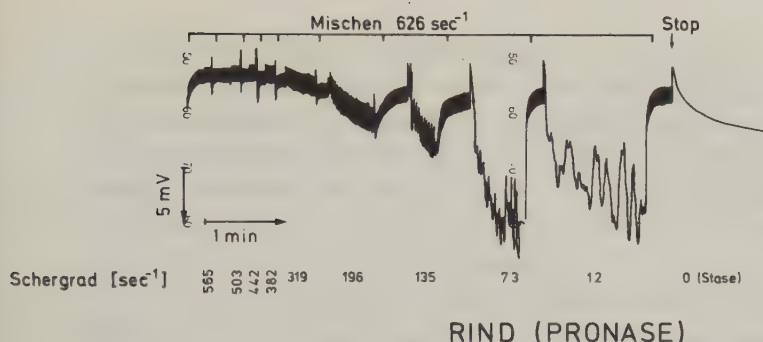


Abb. 27: Originalregistrierung der Lichttransmission von Pronase behandelten Rindererythrozyten in autologem Plasma (s. Legende Abb. 18)

seit den Sedimentationsuntersuchungen von Fahraeus (29) bekannt. Die Ursache hierfür ist weiterhin ungeklärt. Unsere eigenen Versuche sprechen nicht dafür, daß besondere mechanische Eigenschaften der Erythrozyten (verminderte Verformbarkeit) dafür verantwortlich zu machen sind. Auch sind die Plasmaproteine, besonders das Rinderfibrinogen durchaus in der Lage, Erythrozyten zu aggregieren. Wir konnten dies dadurch nachweisen, daß wir mit Ammoniumsulfat gefällten Rinderfibrinogen menschliche Erythrozyten sehr leicht zur Aggregation bringen konnten. Seit den Untersuchungen von COOMBS und UHLENBRUCK (14*/77) ist bekannt, daß Rindererythrozyten auch hinsichtlich ihrer Agglutinationsfähigkeit von menschlichen Erythrozyten verschieden sind. Zur Erklärung dieses Phänomens wurde von den Autoren die Anwesenheit einer Spezies spezifischen "Coating substance" der Erythrozyten postuliert.

Durch Behandlung mit dem Enzym Pronase, welche bei allen untersuchten Tierspezies die Aggregation im homologen Plasma sehr stark steigert, gelingt es auch die Rindererythrozyten im homologen oder autologen Plasma zur Aggregation zu bringen. Diese Aggregation ist außerordentlich scherungsresistent, wird aber zumindest teilweise noch in einem Schergradbereich zwischen 300 und 600 sec⁻¹ dispergiert. Bei Schergraden unter

300 sec^{-1} kommt es jedoch zu einem stetigen Wachstum dieser Aggregate. Dabei ist auffallend, daß deren mittlere Größe nicht konstant ist, sondern man stets sehr kleine (3-5 Erythrozyten) und sehr große (100-10.000 Erythrozyten) Aggregate oder Agglutinate nebeneinander findet. Schon bei einem Schergrad von 135 sec^{-1} findet sich ein deutlich ausgeprägtes Aggregatwachstum mit der Zeit, desgleichen bei einem Schergrad von 73 sec^{-1} .

Bei diesem Experiment, bei welchem eine an Agglutination erinnernde Zellverbackung induziert wird, kommt es noch zu einem bi-phasischen Verhalten der Lichttransmission als Funktion fallender Schergrade. Auffallend ist hier allerdings, daß bei Übergang von niedrigen auf hohe Schergrade (bei der Entmischung) sich nicht sofort ein konstanter Lichttransmissionswert einstellt, sondern, daß derselbe erst allmählich erreicht wird. Es muß daraus geschlossen werden, daß der Vorgang der Dispersion bei hohen Schergraden signifikant langsamer abläuft als bei der üblichen Aggregation, dies ist ein weiteres Zeichen für die hohe Klebrigkeit der Rindererythrozyten nach Pronasebehandlung.

Wie in Abbildung 27 aber außerdem ersichtlich, nimmt die Lichttransmission bei Schergraden zwischen 319, 196, 135, 73 und 12 sec^{-1} jeweils deutlich zu, wobei in dem hier beschriebenen Experiment bei einem Schergrad von 73 sec^{-1} die Lichttransmission am schnellsten zunimmt. Bei der Analyse dieser Kurve muß allerdings berücksichtigt werden, daß bei diesen verhältnismäßig hohen Schergraden ein Gleichgewicht zwischen der durch Scherung induzierten, bzw. durch Scherung wieder dispergierten Zellverklebung zu beobachten ist. Das hier zitierte Beispiel soll nur zur Illustration der Möglichkeit dienen, die mit Hilfe der Rheoskopie und der quantitativen photometrischen Aggregometrie die Phänomene der Aggregation und Agglutination näher differenziert werden können.

Die Diskussion des Wirkungsmechanismus des Enzyms Pronase

würde den Rahmen der vorliegenden Untersuchung sprengen. Inwieweit diese exzessive Steigerung der Zelladhäsivität durch eine Senkung des ζ Potentials bewirkt wird, muß späteren Untersuchungen vorbehalten bleiben. Denkbar wäre auch eine Freilegung antigener Strukturen, die mit im autologen Plasma vorhandenen Antikörpern reagieren.

3.4.2. Zusammenfassende Wertung der Aggregationsexperimente

Tabelle III zeigt summarisch die wichtigsten Ergebnisse der bisher geschilderten Experimente. Die verschiedenen Spezies sind eingeteilt nach solchen, bei denen keine Aggregation stattfindet (Rind und Truthahn), solche mit schwacher Aggregation (Meerschweinchen, Goldhamster und Kaninchen), solche mit Aggregation, die vergleichbar mit der des Menschen ist (Ratte, Katze) und solche, bei denen die Aggregation deutlich stärker als beim Menschen ist (Hund, Schwein und Pferd).

Hierbei ist besonders festzuhalten, daß die für die intravital-mikroskopischen Untersuchung bevorzugten Tiere, nämlich Goldhamster (Backentaschen-Beobachtungen) und Kaninchen (implantierte Ohrkammern) Aggregate aufweisen, die schon mit Schergraden zwischen 0,9 und 2,9 sec^{-1} dispergiert werden. Auch die Ratte, in deren Mesenterium bzw. Mesoappendix häufig Mikrozirkulationsuntersuchungen durchgeführt werden, hat noch eine deutlich geringere Aggregationsneigung. Die Katze ist insofern bemerkenswert, als bei ihr zwar eine in etwa dem Menschen vergleichbare Scherungsresistenz der Aggregate vorhanden ist (wenngleich mit großer Streuung). Die Geschwindigkeit, mit der sich diese Aggregate nach hydrodynamischer Dispersion in Stase ausbilden, signifikant geringer ist. Dem steht gegenüber, daß sich in einer verhältnismäßig großen Zahl der Fälle das Phänomen der Klumpenaggregation, dh. eine fortlaufende Zunahme der Lichttransmission bei 12 sec^{-1} und deshalb ein FSAR-Wert von über 1,0 fand. Das Phänomen, daß sich Erythrozytenaggregate in Stase sehr

Tabelle III

Spezies	$\dot{\gamma}_T \text{ min}$ (sec^{-1})	FSAR	$T_{1/2}$ (sec)	Aggregation
Rind	0	-	-	keine
Truthahn	0	-	-	
Meerschweinchen	0.9 ± 0.4	-	-	schwache
Goldhamster	1.1 ± 1.0	-	-	
Kaninchen	2.9 ± 4.3	-	-	
Ratte	30 ± 22	0.99	5.3 ± 3.5	mittelstarke
Katze	47 ± 35	-	(28.8 ± 9.05)	
Mensch	56 ± 32	0.92 ± 0.03	2.44 ± 0.77	
Hund	110 ± 82	1.03 ± 0.16	4.25 ± 1.7	starke
Schwein	115 ± 35	1.07 ± 0.05	2.2 ± 0.8	
Pferd	580	1.52 ± 0.06	1.5 ± 0.5	

langsam, bei langsamer Scherung aber sehr stark ausbilden, scheint eine Besonderheit bestimmter adhäsivwirkender Plasmaproteine zu sein. Ein ähnliches Verhalten sahen wir bei bestimmten Formen gesteigerter menschlicher Erythrozytenaggregation (primär chronische Polyarthrititis), außerdem bei einer künstlichen Aggregation, welche mit menschlichen Erythrozyten durch das Globulin α_2 Makroglobulin ausgelöst wurde (70).

Beim Hund, beim Schwein und vor allem beim Pferd besteht eine dem Menschen gegenüber sehr deutlich gesteigerte Aggregation. Bei allen diesen Spezies findet sich übrigens eine, wenngleich sehr variable Aggregation nach Defibrinierung des Plasmas: d.h. bei diesen Spezies sind andere Makromoleküle als nur das Fibrinogen für die Erythrozytenaggregation verantwortlich zu machen. Ein ähnliches Verhalten findet sich bei pathologischen menschlichen Blutproben, bei denen durch analytische Versuche das α_2 Makroglobulin, bzw. das Immunglobulin M für diese Form der Erythrozytenaggregation verantwortlich gemacht werden konnte (70).

Die genaue Analyse all jener Faktoren, die bei den hier untersuchten Spezies für die starke Variabilität im Aggregationsverhalten verantwortlich sind, muß späteren Untersuchungen vorbehalten werden. Unsere Untersuchungen sowie Angaben in der Literatur lassen jedoch den Schluß zu, daß dies weder allein durch Unterschiede im Oberflächenpotential (ζ Potential) noch allein durch Unterschiede in der chemischen Zusammensetzung des Plasmas und der Erythrozytenmembran (3/15/28 40/45/46/48/72/73) erklärbar ist. Es muß vielmehr darüber hinaus angenommen werden, daß die Wechselwirkung zwischen Plasma und Erythrozytenmembran, und damit die genaue molekulare Struktur der Erythrozytenmembran im plasmatischen Milieu eine ausschlaggebende Rolle spielt.

Zellaggregation und Lichttransmission

Die oben geschilderten Versuche lassen jedoch eine genauere Analyse des Zusammenhangs zwischen Zellaggregation und Licht-

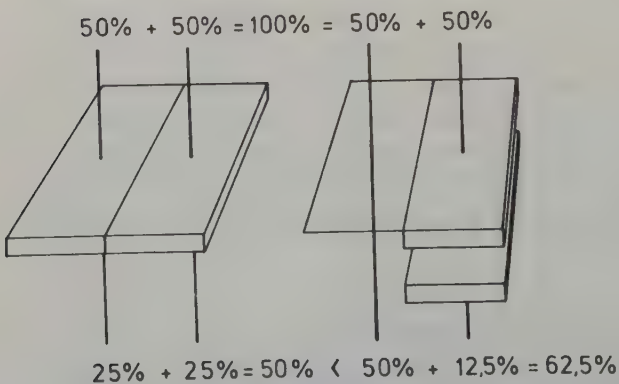
transmission zu. Dies ist zum Verständnis der photometrischen Aggregometrie von großer Bedeutung.

Durch Blut fallendes Licht wird

1. durch Absorption und
2. durch Ablenkung in seiner Intensität vermindert.

Die Absorption hängt 1. vom Plasma ab, 2. von den Erythrozyten. Bei beiden hängt das Ausmaß der Absorption ab von der Konzentration der Kolloide, der spezifischen spektralen Absorption, der Schichtdicke der Blutbestandteile, und deren räumlicher Verteilung. Den überwiegenden Anteil der Gesamtabsorption im weißen Licht hat das Hämoglobin der Erythrozyten neben einem geringeren Anteil der Proteine des Plasmas und den Bestandteilen der Erythrozytenmembran.

Daneben ist aber zu berücksichtigen, daß eine ungleichmäßige Verteilung der Erythrozyten im Raum zu einer geringeren Absorption führt als gleichmäßige. Dazu folgendes Modell: Durch eine Fläche, die mit 2 Platten ausgelegt ist, sollen 50 % des einfallenden Lichtes absorbiert werden. Legt man in der gleichen Fläche die beiden Platten übereinander, so kommt 62,5 % des einfallenden Lichtes hindurch.



Intensität des einfallenden Lichtes

Intensität des durchfallenden Lichtes

Dieser Einzeleffekt ist zwar für Erythrozyten sehr viel geringer als in dem angeführten Beispiel, summiert sich aber je nach Schichtdicke. Die ungleichmäßige Verteilung kann durch Aggregation zustande kommen, bei der sich die Erythrozyten in Gruppen zusammenlagern und zwischen diesen Aggregaten zellfreie Plasmalücken freilassen. Dieses Phänomen wird tatsächlich im Rheoskop beobachtet und erklärt einen Teil der Lichttransmissionszunahme durch Zellaggregation.

Ein anderer Teil der Lichtzunahme erklärt sich jedoch durch Unterschiede in der Lichtstreuung. Von dem einfallenden Licht wird durch Streuung, Brechung und Reflexion ein Teil abgelenkt, der von der Partikelgröße, dem Verhältnis der Brechzahlen dem Auftreffwinkel des Lichtes auf die Grenzflächen und der effektiven Größe dieser Grenzflächen bestimmt ist. Die effektive Fläche ist derjenige Anteil der Grenzfläche, an dem tatsächlich Licht abgelenkt wird. Der größte Unterschied der Brechzahlen dürfte über die Membran der Erythrozyten auftreten, d.h. zwischen dem extrazellulären Plasma und dem intrazellulären Hämoglobin.

Orientieren sich die Erythrozyten in der Strömung als Funktion der auf sie einwirkenden Schubspannung an der Grenzfläche zwischen Zelle und Plasma, so können sich der Auftreffwinkel des Lichtes und die effektive Größe der Grenzfläche ändern. Eine Zunahme der Lichttransmission erfolgt dann, wenn der mittlere Auftreffwinkel der Lichtstrahlen näher an 90° herankommt, da dadurch die Ablenkung durch Reflexion und Brechung geringer wird. Das ist aber der Fall, wenn die Erythrozyten durch Scherung in der viskometrischen Strömung in regelmäßige Ellipsoide verformt und mit ihrer Hauptachse parallel zur Strömungsrichtung ausgerichtet werden (Abb. 35). Ist die optische Achse dann senkrecht zur Ebene der Scherung ausgerichtet, nimmt die Lichtstreuung ab und damit die Lichttransmission zu.

Der gleiche Effekt, wenngleich aufgrund eines anderen Mechanismus, wird durch die Aneinanderlagerung der Erythrozyten in Aggregate erreicht. Durch die sehr enge Aneinander-

lagerung der Erythrozytenmembran, wie sie durch ihre hohe Verformbarkeit möglich ist, kann bekanntlich ein Brei von Erythrozyten nahezu transparent werden. Innerhalb eines einzelnen Aggregates dürfte ein durchaus ähnliches Phänomen auftreten. Wenn auch nur jeweils 2 Erythrozyten in einem Aggregat aneinander gelagert sind, nimmt die effektiv brechende Fläche zwischen Plasma und Hämoglobin fast um die Hälfte ab.

Während der Sedimentation können die Erythrozytenmembranen noch weiter in Kontakt kommen und es kommt deshalb während dieses Vorgangs zu einem langsamen Anstieg der Lichttransmission in Stase, und zwar auch dann, wenn die Erythrozyten nicht in der Form typischer Geldrollen aggregieren wie dies beim Rind und Truthahn der Fall ist. Stechäpfel die keinen engen Kontakt der Membranen erlauben, lassen die Zunahme der Lichttransmission in Stase vermissen (Abb. 32).

Das Ausmaß der schnell einsetzenden Lichttransmissionszunahme in aggregierenden Blutproben ist mit der Aggregatgröße und zusätzlich noch mit der Form der Aggregation korreliert. Lagern sich die Erythrozyten lediglich zu Rouleaux zusammen, so resultiert daraus eine geringere Abnahme der effektiven Grenzfläche und damit auch eine geringere Zunahme der Lichttransmission als bei Klumpenaggregation (Abb. 31, 33, 34). Zur Bildung der Klumpenaggregation ist es notwendig, daß sie passiv durch schwache Kräfte der Strömung miteinander in Kollision gebracht werden. Dementsprechend bilden sie sich in Stase nur in sehr geringem Maße aus. Bei sehr stark aggregierenden Blutproben (z.B. beim Pferd) konnte allerdings beobachtet werden, daß sich sehr dichte Aggregate beim Übergang von schneller Strömung auf Stase dadurch bildeten, daß die Aggregate sich quasi elastisch kontrahierten. Desungeachtet war in allen Fällen dieser gesteigerten Aggregation die Lichttransmission bei langsamer Scherung d.h. passiven Kontakt der Aggregate wesentlich größer, eine Tatsache, die sich durch den numerischen Wert des FSAR (größer als 1.0) belegen läßt. Suspen-

sionen von gehärteten Erythrozyten, welche sich weder verformen können, noch aggregieren, noch sich in der Strömung orientieren, ändern ihre Lichttransmission nicht als Einfluß einwirkender Schergrade. Erythrozyten wie die des Truthahns und des Frosches (44), die schon in Ruhe eine ellipsoide Form aufweisen, orientieren sich lediglich in der Strömung. Dementsprechend ist bei ihnen die Lichttransmission schon bei langsamer Strömung höher als in Stase, sie steigt jedoch mit zunehmender Strömungsgeschwindigkeit nicht weiter an. Sind die Erythrozyten, wie beim Rind, zwar verformbar, aggregieren aber nicht, so nimmt die Lichttransmission mit steigendem Schergrad infolge der Verformung und Ausrichtung zu.

Blut, dessen Erythrozyten zusätzlich reversibel aggregieren, weist bei Zunahme der Schergrade zwischen Stase und etwa 600 sec^{-1} zwei, hinsichtlich ihres Lichttransmissionseffektes, gegensätzliche Prozesse auf. Die Aggregation in Stase bewirkt eine Lichttransmissionszunahme, die mit zunehmender Desaggregation bei einem Schergradbereich zwischen 0 und etwa 50 sec^{-1} zunächst abnimmt. Im Anschluß an diese hydrodynamische Desaggregation werden mit weiterer Steigerung der an den Grenzflächen zwischen Plasma und Zellen einwirkenden Kräfte die Zellen orientiert und deformiert, was mit einer sekundären Zunahme der Lichttransmission verbunden ist. Damit ist es zwar nicht möglich, aus der absoluten Lichttransmission ein quantitatives Maß für Aggregation und oder Deformation abzuleiten, ohne dies durch zusätzliche Untersuchungen zu stützen. Es läßt sich jedoch mit Hilfe der Lichttransmission derjenige Schergrad feststellen, von dem ab der eine Vorgang den anderen überwiegt. Dieser Schergrad ist direkt korreliert, mit der Adhäsivität der Plasmaproteine bzw. der Erythrozyten. Zu den Faktoren, welche in die Scherungsresistenz eines Aggregats eingehen, kommt jedoch noch die Verformbarkeit der Erythrozyten, ferner die Form der Primäraggregate und ihre Orientierung in der Strömung. Nicht ganz geklärt ist die langsame Abnahme der Lichttrans-

mission in Stase nach schneller Scherung, die bei nicht aggregierenden Blutproben (Rind, Truthahn und Frosch), ferner bei schwach aggregierenden Blutproben (Meerschweinchen, Kaninchen und Goldhamster) und schließlich sogar bei der Katze beobachtet wurde. Möglicherweise handelt es sich dabei sogar um langsame Desorientierung der in der Strömung ausgerichteten oder langsame Formänderungen der in der Strömung verformten Erythrozyten. Es könnte auch sein, daß diese Abnahme latent bei den anderen Tieren vorhanden sind, jedoch durch die schnelleren Prozesse der Aggregation überlagert wird.

3.5. Deformation von Erythrozyten in hochviskösen Medien

Das Ausmaß der Deformation eines Körpers in ein Ellipsoid läßt sich als Elliptizität D als der Quotient aus der Differenz und der Summe der Hauptachsen L und B einer Ellipse angeben. Da die Erythrozyten in Ruhe annäherungsweise eine Kreisfläche aufweisen, ist D dabei 0. Mit zunehmender Elliptizität nähert sich der Quotient dem Wert 1.0. Bei der Deformation der in Ruhe bikonkaven Erythrozyten in Ellipsoide werden sie gleichzeitig in der Strömung orientiert, so daß ihre größere Hauptachse parallel zur Strömungsrichtung ausgerichtet ist. Wahrscheinlich besteht jedoch zwischen der Hauptachse L und der Ebene der Scherung ein Winkel α , dessen Größe allerdings unbekannt ist und auch mit der Methode der Rheoskopie nicht ohne weiteres feststellbar ist. Da im Rheoskop die Abbildungsebene parallel zur Ebene der Scherung steht, läßt sich nicht die wahre Länge des zum Ellipsoid ausgezogenen Erythrozyten, sondern nur die Projektion L' auf die Abbildungsebene auf den Mikrophotogrammen auswerten. Auch für die Berechnung der scheinbaren Elliptizität D' wählen wir daher die Formel:

$$D' = \frac{L' - B'}{L' + B'}$$

Mit Hilfe dieser Formel ist es möglich, die bei Erythrozyten in viskometrischer Strömung in hochviskösen Medien gemessene Deformationen quantitativ als Funktion des einwirkenden Scher-

grades zu bestimmen, was für jede Blutprobe, bzw. für jeden Schergrad für etwa 60 - 80 Erythrozyten durchgeführt wurde.

3.5.1. Für die Messung wurden Schweine-Erythrozyten und Rinder-Erythrozyten zunächst in einer 35 %igen isotonen Lösung von Dextran mit einem mittleren Molekulargewicht von 40 000 verwendet, dabei trat auch bei niedrigsten Schergraden keinerlei Aggregation auf. Die Verformung D' als Funktion der einwirkenden Schubspannung τ ist in Abbildung 28 gezeigt.

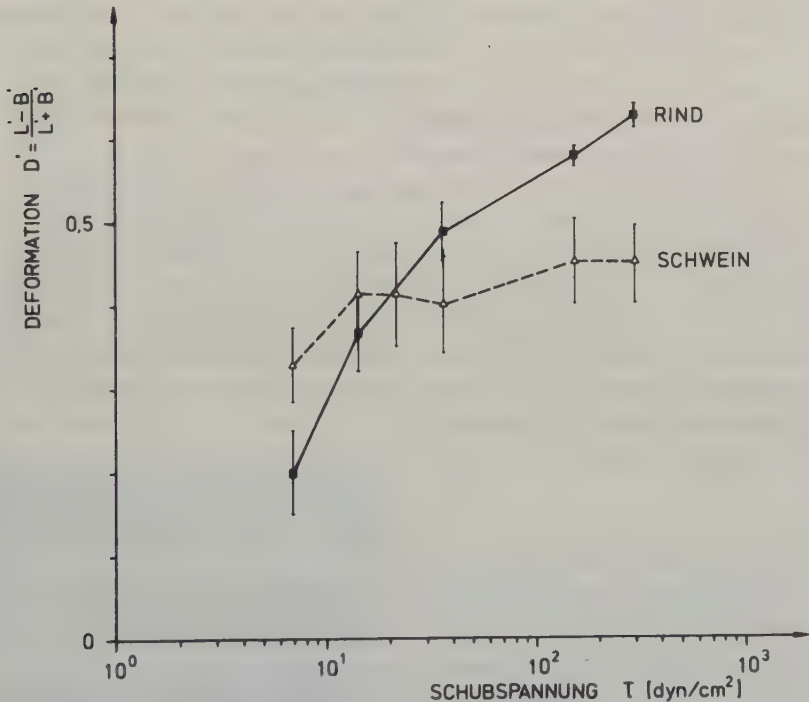


Abb. 28: Deformation der Erythrozyten in Dextran 40 Lösung 35 g%, 60 cP, 23 °C

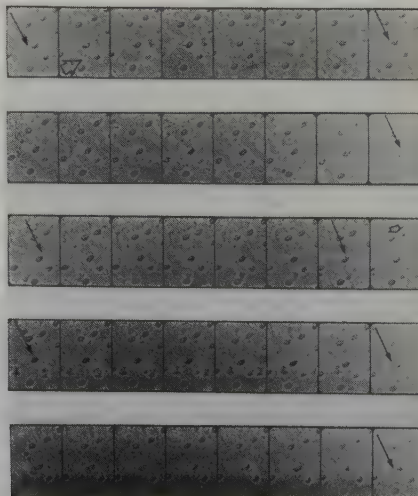
Auch hierbei zeigen sich deutliche Speziesunterschiede. Schweineerythrozyten werden bereits bei einer Schubspannung von 10 dyn/cm^2 so stark verformt, daß $D' \text{ ca. } 0.35$ ist. Weitere Zunahme der Schubspannungen steigert das Ausmaß der Deformation jedoch nicht mehr. Demgegenüber zeigen Rindererythrozyten zwischen $7 - 500 \text{ dyn/cm}^2$ eine progressive Zunahme der Elliptizität.

Dieser Befund, welcher durch weitere Untersuchungen näher abgeklärt werden muß, ist jedoch insofern bemerkenswert als die Fließfähigkeit gepackter Erythrozyten bei Rind und Schwein genau umgekehrt mit der Schubspannung korreliert war (siehe Seite 32). Wodurch diese Diskrepanz bedingt ist und war, ihre hämodynamische Bedeutung ist, muß in weiteren Untersuchungen erst noch geklärt werden.

In diesem System konnte auch die panzerkettenartige Rotation der Erythrozytenmembran gezeigt werden. Abbildung 29 zeigt die Einzelbilder eines 16 mm Films der mit 25 Bilder/sec aufgenommen wurde. Die menschlichen Erythrozyten sind in der Dextran 40 Lösung (60cP) bei 20 sec^{-1} einer Schubspannung von 12 dyn/cm^2 ausgesetzt. Der große offene Pfeil oben gibt die Strömungsrichtung an. Alle Zellen sind zu Ellipsoiden verformt, die mit ihren Hauptachsen in der Strömung ausgerichtet sind.

Abb. 29:

Erythrozyten in Dextran 40
Lösung 35 g%,
Beschreibung siehe Text



40ms

Ausgefallene Fibrinpartikel haben sich zum Teil den Erythrozytenmembranen angelagert. Ein Partikel kann man bei seiner Wanderbewegung vom hinteren Ende des Erythrozyten (1.Streifen, 1.Bild, dünner Pfeil) über 640 msec (1.u.2. Streifen) zum vorderen Ende (2.Streifen, 8.Bild) und zurück (4.Streifen, letztes Bild) verfolgen.

Im Film sieht man, daß sich dieser Vorgang dauernd wiederholt und dabei die Zelle immer gleichbleibend verformt und ausgerichtet ist und nicht taumelt. Dies kann nur mit der Membranrotation um den flüssigen Inhalt des Erythrozyten erklärt werden. Die Membran selbst ist im Lichtmikroskop nicht sichtbar. Für die Membran muß da auch bei extrem langgestreckter Verformung keine Falten auftreten, eine leichte Verschiebbarkeit der Membranelemente bei Scherung, in der Membranebene angenommen werden (72).

Da sich bei Verringerung der Schubspannung die Form der Erythrozyten mehr der Kreisform nähert, zeigt das Vorhandensein von elastischen Rückstellkräften, die wahrscheinlich durch die Biegesteifigkeit der Membran bedingt sind (7/8).

Die Aufschwemmung von Erythrozyten in hochviskösen Dextranlösungen führte in späteren Versuchen nach verhältnismäßig kurzer Zeit zu spontaner Stechapfelbildung, bzw. zur Bildung von Stomatozyten.

3.5.2. Um die Verformbarkeit in einem weniger körperfremden Milieu untersuchen zu können, entschlossen wir uns daher, Rindererythrozyten in ultrafiltriertem Rinderserum, das wir auf etwa 50 g% Gesamtkonzentration eingedickt hatten, zu untersuchen. In einer solchen hochkonzentrierten Eiweißlösung, deren Viskosität 165 cP betrug, lagern sich Rindererythrozyten, die in unverdünntem Plasma niemals aggregieren, in typische Geldrollen aneinander (Abb. 36). Dieser Vorgang geschieht allerdings sehr langsam und die Aggregate werden schon durch geringste Scherung sofort wieder dispergiert, und die ein-

zelenen Erythrozyten dann wie in der Dextranlösung zu Ellipsoiden verformt. Mit Hilfe dieses extremen Experimentes läßt sich also zeigen, daß sich Rindererythrozyten in Bezug auf die Aggregation nicht qualitativ sondern nur quantitativ von denen anderer Tierspezies unterscheiden.

3.4.3. Ungeachtet der geringfügigen und sehr scherungslabilen Aggregation eignet sich jedoch das System auch hochkonzentriertem Serum und Erythrozyten dazu, die Deformation der Zellen als Funktion steigender Schubspannungen und steigender Viskositäten der kontinuierlichen Phase zu untersuchen. Schon früher hatte sich zeigen lassen, daß für jede gegebene Schubspannung die Deformation umso höher ist, je höher die Viskosität des kontinuierlichen Mediums, dh. je kleiner der Quotient aus den Viskositäten der dispersen (Hb-Lösungen in Erythrozyten) und kontinuierlichen Phase ist. Dies ließ sich schon aus der von TAYLOR angegebenen Formel vermuten, die für die Deformation von Flüssigkeitstropfen unter Scherung aufgestellt wurde (75/76). Diese Formel läßt sich jedoch nicht als Nährung für die sehr starke Verformung von Erythrozyten in viskosimetrischer Strömung im Rheoskop verwenden:

1. im Gegensatz zu den Bedingungen im Experiment von TAYLOR ist die Betrachtungsebene parallel zur Ebene der Scherung, während bei TAYLOR die Betrachtungsebene senkrecht auf der Ebene der Scherung stand.
2. TAYLOR hatte die Formel nur für sehr kleine Deformationen angegeben, d.h. von nur geringfügiger Abweichung von der Kugelform.
3. Die Formel gilt nur, wenn eine Interaktion zwischen den Flüssigkeitstropfen und der scherenden Grenzfläche vernachlässigt werden kann, d.h. wenn das Tröpfchen sehr weit von der Oberfläche entfernt ist. Alle diese Bedingungen sind im Rheoskop nicht gegeben.
4. Vor allem ist aber zu berücksichtigen, daß im Gegensatz

zur Verformung von in Ruhe sphärischen Flüssigkeitstropfen, bei denen stets eine Dehnung der Membranfläche Voraussetzung für die Deformation ist, beim Erythrozyten eine solche Deformation zum mindesten theoretisch ohne Zunahme der Gesamtoberfläche der Zelle möglich ist.

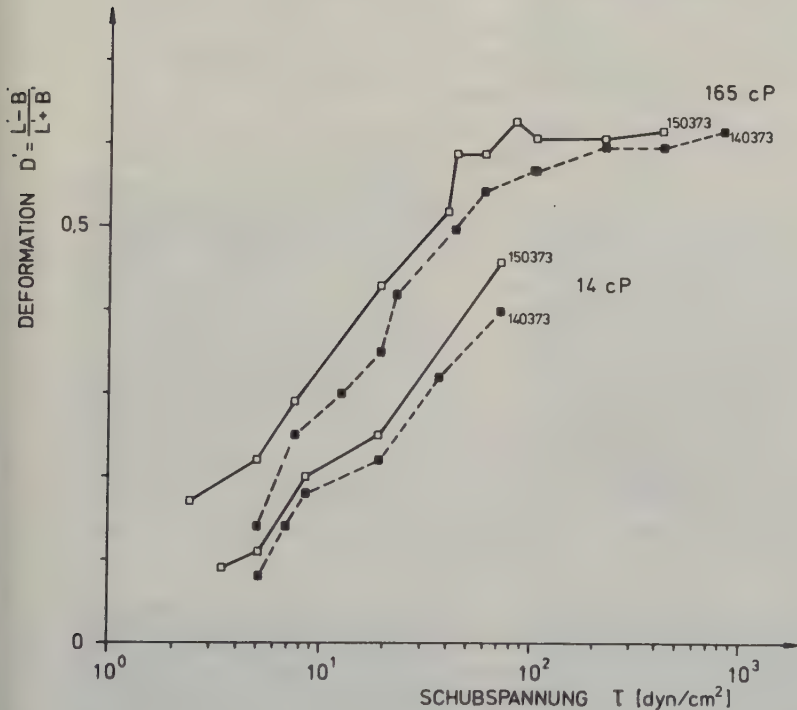


Abb. 30: Deformation von Rindererythrozyten in ultrafiltriertem Rinder Serum, 165 cP, 42 g% Prot. 14 cP, 27 g% Prot., 23°C, Ergebnisse von zwei Experimenten.

Ungeachtet der noch verbleibenden theoretischen Probleme zeigt Abbildung 29, daß tatsächlich auch beim Erythrozyten außer der an der Grenzfläche einwirkenden Schubspannung auch die Viskosität der kontinuierlichen Phase entscheidend in die tatsächlich erzielte Deformation eingeht. Mit Hilfe

der im Rheoskop quantifizierbaren Deformation der Erythrozyten, bzw. im Vergleich zwischen Erythrozyten und einfachen Flüssigkeitstropfen kann eine dem Erythrozyten angemessenere Theorie entwickelt werden. Hierzu eignet sich besonders gut das System von Rindererythrozyten in verschieden stark konzentrierten Rinderseren, die Erythrozyten anderer Spezies können im Serum bzw. Plasma nicht untersucht werden, da bei ihnen die Aggregation bei niedrigen Schubspannung überwiegt. Auf Grund der vorliegenden Untersuchungen, die nur teilweise in Abbildung 29 wiedergegeben sind, wird zur Zeit durch T.K.SANDBERG und K.A. KLINE (Wayne State University, Detroit Michigan) eine erweiterte Theorie der Erythrozytendeformation erarbeitet.

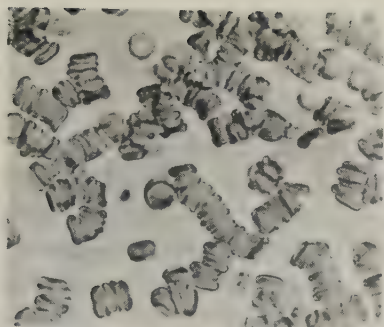


Abb. 31: Rouleauxaggregate
(Ratte) in Ruhe

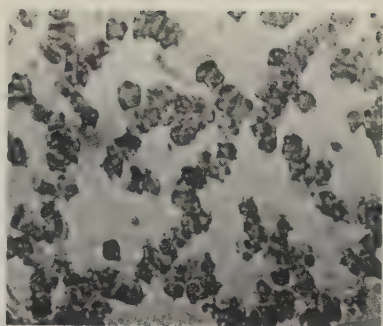


Abb. 32: Spontane Stechäpfel
(Ratte) in Ruhe



Abb. 33: Klumpenaggregate
(Hund) bei 12 sec⁻¹

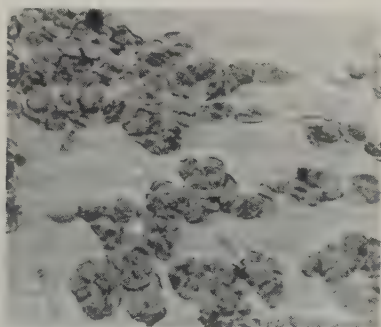


Abb. 34: Klumpenaggregate
(Katze) bei 12 sec⁻¹

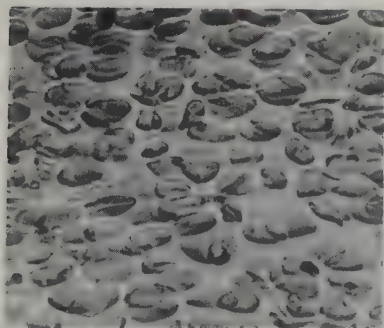


Abb. 35: Verformung durch Aus-
richtung der Erythro-
zyten bei 626 sec⁻¹
(Goldhamster)

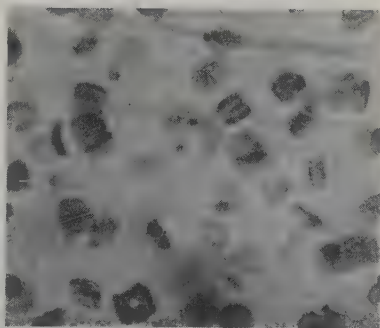


Abb. 36: Aggregate von Rinder-
erythrozyten in einge-
dicktem Rinderserum,
42 g% in Ruhe

4. Allgemeine Diskussion

Die Bedeutung der Fließeigenschaften des Blutes für die Physiologie der Blutströmung in den Gefäßen der Endstrombahn bedarf keiner besonderen Erläuterung. Die herkömmlichen hämorrheologischen Methoden erfassen nur das makroskopische Fließverhalten von Vollblut. Dessen anomale Viskosität beruht indes auf Einzelfaktoren, wie Deformation und Aggregation von Erythrozyten, die bekanntermaßen auch die Strömung des Blutes in der Endstrombahn entscheidend mitbestimmen.

Dennoch ist es notwendig, zum Verständnis der Mikroirkulation mikrorheologische Methoden zu entwickeln. Darüber hinaus ermöglichen solche Methoden ein genaueres Studium der mechanischen Eigenschaften von Einzelerythrozyten, bzw. von Erythrozytenaggregaten, was in sich selbst von großem wissenschaftlichem Interesse ist, da molekulare Mechanismen, die für die Blutströmung relevant sind hiermit aufgeklärt werden können.

Die mechanischen Eigenschaften des Erythrozyten stehen hierbei ganz im Vordergrund des Interesses. Sie sind dafür verantwortlich, daß sich der Erythrozyt unter allen denkbaren Bedingungen an die Strömung anpaßt: hierbei ist nicht nur die gewerkugelartige Verformung in den nutritiven Kapillaren von Bedeutung, sondern auch die fortlaufende Orientierung, Deformation und Panzerkettenrotation der Erythrozyten. Beide Arten der Deformation erleichtern die Anpassung des Erythrozyten an die Strömung, vermindern seinen hydrodynamischen Effekt auf die Strömung des Plasmas und senken so die scheinbare Blutviskosität unter allen denkbaren Bedingungen. Diese Eigenschaften weisen alle Erythrozyten jener Tierspezies auf, bei denen der Erythrozyt keinen Kern enthält. Bei ihnen muß der Erythrozyt als ein Flüssigkeitstropfen besonderer Art verstanden werden, dessen mechanisches Verhalten sich aus der Tatsache

erheilt, daß das Verhältnis von Oberfläche zu Volumen nicht wie in einem sphärischen Flüssigkeitstropfen minimalisiert ist. Mit diesem verblüffend einfachen Trick gelingt es der Natur, den Transport von Hämoglobin durch sehr enge nutritive Kapillaren zu optimieren. Dies wird besonders deutlich, wenn man die phylogenetische Entwicklung vom Kaltblüter und Vogelerythrozyten zum Säugererythrozyten verfolgt:

der Hämoglobingehalt und damit die Sauerstofftransportkapazität nimmt zu, während gleichzeitig der minimale Durchmesser, durch welche solche Transportvehikel passieren können, abnimmt. Dadurch werden sowohl der Sauerstoffnachschub als auch die Diffusionsbedingungen für Sauerstoff optimiert.

Die starke Verformbarkeit der Erythrozyten hat aber zur Folge, daß in Ruhe, bzw. unter dem Einfluß sehr schwacher hydrodynamischer Kräfte, die normalerweise im Plasma der meisten Säuger vorkommenden Makromoleküle in der Lage sind, eine Verklebung der Erythrozyten in Form typischer Geldrollen herbeizuführen. Die Rindererythrozyten machen hiervon eine bemerkenswerte Ausnahme. Dies gilt aber nur insofern, als bei den Rindererythrozyten ungleich höhere Konzentrationen dieser Makromoleküle notwendig sind, um eine formal gleichartige Aggregation auszulösen. Das Zusammenspiel zwischen leicht verformbaren, d.h. leicht aneinander anschiegbaren Oberflächen der Erythrozyten und asymmetrischen Makromolekülen verursacht nicht nur die Aufgabe der Individualität und damit Verformbarkeit des Erythrozyten, sondern sie führt zu einer mehr oder weniger kontinuierlichen Struktur von Erythrozytenaggregate, welche die scheinbare Viskosität des Blutes erheblich ansteigen läßt. Dabei kommt es gleichzeitig zu Entmischungsphänomenen, so daß das Ausmaß des Viskositätsanstiegs unter den verschiedenen Strömungsbedingungen in vivo bisher nur schwer erfaßbar ist. Die Entmischungsvorgänge verlaufen qualitativ wie quantitativ bei den verschiedenen

Tierspezies unterschiedlich, auch beim Menschen unterscheidet sich die physiologische von der pathologisch auftretenden Aggregation in dieser Hinsicht. Die in dieser Arbeit vorgestellten Methoden lassen erwarten, daß in Zukunft die Details dieses Aggregationsverhaltens detailliert studiert werden können, um dann die hämodynamische Bedeutung der Aggregationsphänomene und ihren Stellenwert bei Störungen der Mikrozirkulation zu untersuchen. Erst nach einer solchen Analyse wird es möglich sein, die Bedeutung hämorheologischer Faktoren in der Pathologie abzuschätzen und sie gegenüber anderen Faktoren, wie zum Beispiel der Vasomotorik, der Gefäßgeometrie bzw. dem Schwellungszustand des Endothels abzugrenzen. Für solche Untersuchungen sind vor allem Tierexperimente notwendig: Ergebnis der vorliegenden Arbeit ist jedoch, daß keine der untersuchten Tierspezies hinsichtlich des hämorheologischen Verhaltens mit dem Menschen übereinstimmt. Diese Tatsache ist sowohl hinsichtlich der Deutung früherer als auch hinsichtlich der Planung zukünftiger Experimente von großer Wichtigkeit.

5. Zusammenfassung

Zum Studium der Mikrorheologie wurde das gegenrotatorische Rheoskop entwickelt. Es macht die Beobachtung strömenden Blutes bei starker Vergrößerung und mit speziellen Optiken möglich und erlaubt gleichzeitig die Quantifizierung des Aggregationsverhaltens der Erythrozyten durch eine abgewandelte Methode der Lichttransmissionsmessung bei kleinen Blutvolumina (20 μ l).

Es wurden an Hund, Katze, Ratte, Goldhamster, Meerschweinchen, Kaninchen, Rind, Pferd, Schwein, Truthahn und Mensch vergleichend folgende Untersuchungen durchgeführt:

1. Viskosimetrie von Blut und gepackten Erythrozyten,
2. Filtration von Erythrozytensuspensionen durch 5 μ m Poren,
3. Aggregometrie durch Messung der Lichttransmission,
4. Verformbarkeit von Erythrozyten in hochviskösen Medien.

Nach dem Aggregationsverhalten lassen sich die Tiere in folgende Gruppen einteilen:

1. Keine Aggregation (Rind, Truthahn),
2. schwache Aggregation (Meerschweinchen, Goldhamster, Kaninchen),
3. mittelstarke Aggregation (Ratte, Katze, Mensch),
4. starke Aggregation (Hund, Schwein, Pferd).

Diese Unterschiede zeigen sich auch, wenngleich nicht immer ganz eindeutig, in den Viskositätsprofilen.

Auch die Experimente zur Messung der Verformbarkeit der Erythrozyten ergaben sowohl bei der Viskosimetrie gepackter Erythrozyten als auch bei der Filtration erhebliche Speziesunterschiede. Diese weisen aber wegen Fehlermöglichkeiten der

Methode und durch spontane Stechapfelbildung während der Präparation eine große Varianz auf.

Bemerkenswert ist die Tatsache, daß die Fluidität von gepackten Rindererythrozyten oberhalb von 5 dyn/cm^2 nicht mehr zunimmt, wie dies bei den anderen Spezies beobachtet wird.

Die Verformung von Erythrozyten in hochviskösen Medien ergab einen deutlichen Einfluß der Viskosität der kontinuierlichen Phase. Außerdem konnte die panzerkettenartige Rotation der Erythrozytenmembran bei menschlichen und bovinen Erythrozyten gefilmt werden, und somit der Beweis für die Theorie erbracht werden, daß Erythrozyten sich in schneller Strömung ähnlich wie Flüssigkeitstropfen verhalten, Blut also Eigenschaften einer Emulsion aufweist.

6. Literaturverzeichnis

1. Barer, R. und F.M. Gaffney:
Nature 177, 277 f, 1956
2. Berman, H.J., and R.L. Fuhro: Proc.VIIth Conf. on
Microcirculation Aberdeen (Karger, Basel) 1973
3. Bernstein, R.E.:
Science 120, 459, 1954
4. Bessis, M., J.R. Weed und P.F. Leblond: Red cell shape,
Springer Berlin, 1973
5. Braasch, D.:
Pflügers Arch. ges. Physiol. 278, 130-140, 1963
6. Brinkmann, R., W.G. Zijlstra und N.J. Jansonius:
Proc. Kon. Nederl. Acad. Wet. ser. G 66, 236-248, 1963
7. Bull, B.S.:
Nouvelle Revue Franc. d'Hématol. 12, 835-844, 1972
8. Bull, B.S. und I.B. Brailsford:
Blood 41, 833-844, 1973
9. Burton-Opitz R.:
Arch. f. gesam. Physiol. 82, 447, 1900 a
10. Burton-Opitz R.:
Arch. f. gesam. Physiol. 82, 460-463, 1900 b
11. Burton-Opitz R.:
Amer. J. Physiol. 7, 243, 1902
12. Burton-Opitz R.:
Pflügers Arch. 119, 359, 1907
13. Chaplin, H.J. und P.L. Mollison:
Blood 7, 1227, 1952
14. Charm, S.E. und G. Kurland:
Amer. J. Physiol. 203, 417-421, 1962
- 14* Coombs, R.R.A., M.H. Gleeson-White and J.G. Hall:
Brit. J. Exp. Path. 32, 195-202, 1951

15. De Gier, J. und L.L.M. van Deenen:
Biochim. Biophys. Acta 49, 286-296, 1961
16. Chien, S., S. Usami, M.H. Taylor, J.L. Lindberg, M.I. Gregersen:
J. Appl. Physiol. 21, 81-87, 1966
17. Chien, S., S. Usami und R.J. Dellenback und M.I. Gregersen:
Science 157, 827-829, 1967
18. Chien, Dellenback, S. Usami, G. Seaman und M.I. Gregersen:
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 127, 982-985, 1968 a
19. Chien, S., R.J. Dellenback, S. Usami, G.V.F. Seaman und
M.I. Gregersen:
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 127, 982-985, 1968 b
20. Chien, S., S. Usami, R.J. Dellenback and C.A. Bryant:
Change of erythrocyte deformability during fixation in
acetaldehyde. Proc. sec. intern. Conf. 1969, In: Theore-
tical and Clinical Hemorheology (Eds.) H.H. Hartert and
A.L. Copley, Springer-Verlag (Berlin-Heidelberg-New York)
136-143, 1971
21. Chien, S., S. Usami, R.J. Dellenback and I.M. Gregersen:
Influence of fibrinogen and globulins on blood rheology
at low shear rates: Comparison among elephant, dog and
man. Proc. sec. intern. Conf. 1969, In: Theoretical and
Clinical Hemorheology (Eds.) H.H. Hartert and A.L. Copley,
Springer-Verlag (Berlin-Heidelberg-New York) 144-153, 1971
22. Chien, S., S. Usami, R.J. Dellenback und M.I. Gregersen:
Am. J. Physiol. 219, 143-153, 1970
23. Chien, S., S. Usami und R.J. Dellenback:
Biorheology 8, 35-57, 1971
24. Chien, S., S.A. Luse und C.A. Bryant:
Microvasc. Res. 3, 183-203, 1971
25. Cokelet, G.R. und H.J. Meiselman:
Science 162, 275-277, 1968
26. Dintenfass, L.:
Nature, 219, 956-958, 1968

27. Evans, E. und Y.C. Fung:
Microvasc.Res. 4, 335, 1972
28. Evans, J.V. und H.T. Phillipson:
J.Physiol. 139, 87, 1957
29. Fahraeus, R.:
Physiol. Rev. 9, 241-274, 1929
30. Frei, W.:
Zeitschr. f. Infektionskrh. d. Haustiere 6, 363, 1909
31. Fung, Y.C.:
Fed.Proc. 25, 1761-1772, 1966
32. Fung, Y.C. und P. Tong:
Biophysic.J. 8, 175-198, 1968
33. Furchgott, R.F.:
J. exp. Biol. 17, 30, 1940
34. Gregersen, M.I. and C.A. Bryant:
Evaluation of deformability of red cells by sieving tests.
Proc. 1st Int.Conf., Reykjavik 1966. In: Hemorheology
(Ed.) A.L. Copley, Pergamon Press (Oxford-London-Edin-
burgh) 539-547, 1968
35. Gregersen, M.I., C.A. Bryant, W.E. Hammerle, S. Usami und
S. Chien:
Science 157, 825-827, 1967 a
36. Gregersen, M.I.:
Bibl.Anat. 9, 276-281, 1967 b
37. Gregersen, M.T., S. Usami, C.A. Bryant, V. Magazinovic and
S. Chien:
Evidence of species differences in erythrocytes deformabi-
lity by filtration through micropores (polycarbonate sieves).
Proc. 5th Int.Congress on Rheology, Kyoto, 1968 (Ed.) S. Onogi,
Tokyo University, Tokyo and University Park Press, Balti-
more, Md. and Manchester, England, 1970

38. Guest, M.M, T.Bond, R.G.Cooper und J.R.Derrick:
Scienc 142, 1319-1320, 1963
39. Hochmuth, R.M. und N. Mohandas:
Microvasc. Res. 4, 295-297, 1972
40. Hoffmann, I.F.:
J.cell and comp. Physiol. 47, 261-287, 1956
41. Jacobs, H.R.:
Biorheology 1, 129-138, 1963 a
42. Jacobs, H.R.:
Biorheology 1, 233-238, 1963 b
43. Hürthle, K.:
Pflügers Arch. 82, 415, 1900
44. Klose, H.J., E.Volger und H. Brechtelsbauer:
Pflügers Arch. 333, 126-139, 1972
45. Mehrishi, J.N.:
Ärztl.Lab. 18, 225-229, 1972
46. Mitchison, J.M.:
J. exp.Biol. 30, 397, 1953
47. Nakao, M., T. Nakao und S. Yanazoe:
J. Biochem. 49, 487-492, 1961
48. Nelson, G.J.:
Biochem. Biophys. Acata 144, 221, 1967
49. Ponder, E.:
J.gen.Physiol. 29, 89-102, 1944
50. Rosenblum, W.J. und R.M.Asofski:
J.Lab.Clin.Med. 71, 201-211, 1968
51. Rosenblum, W.J.:
Microvasc.Res. 3, Nr. 3, 1971
52. Sobin, S.S. und H.M.Tremer:
Microvasc.Res. 4, 330, 1972

53. Schlick, W. and H.Schmid-Schönbein:
Blood Cells, 1, 333-338, 1975
54. Schmid-Schönbein, H. und P.Gaehtgens:
Pflügers Arch. ges. Physiol. 297, 107-114, 1967
55. Schmid-Schönbein, H., P.Gaehtgens und Hirsch:
J.clin.Investig. 47, 1447-1454, 1968
56. Schmid-Schönbein, H., R.E.Wells und R.Schildkraut:
J.Appl.Physiol. 6, 674-678, 1969
57. Schmid-Schönbein, H. und R. Wells:
Science 165, 288-291, 1969
58. Schmid-Schönbein, H., R. Wells und J.Goldstone:
Circ.Res. XXV, 131-143, 1969
59. Schmid-Schönbein, H., R.Wells and J. Goldstone:
Model experiments in red cell rheology: The mammalian
red cell as a fluid drop. Proc.sec.intern.Conf. 1969,
In: Theoretical and Clinical Hemorheology (Eds.) H.H.Hartert
and A.L.Copley, Springer-Verlag (Berlin-Heidelberg-New York)
233-241, 1971
60. Schmid-Schönbein, H.:
Hemodynamic significance of red cell fluidity, 6th Europ.
Conf.Microcir. Aalborg 1970a, (Karger, Basel) 2-7, 1971
61. Schmid-Schönbein, H.: Rheologische Eigenschaften von Erythro-
cyten;
Habilitationssarbeit LMU München 1970 b
62. Schmid-Schönbein, H., R.E.Wells und J.Goldstone:
Biorheology 7, 227-234, 1971
63. Schmid-Schönbein, H., H.J.Klose and E.Volger:
Effect of colloidal plasma substitutes on microrheology
of human blood. In: Hemodilution: Theoretical basis and
clinical application. K.Messmer and H.Schmid-Schönbein,
(Eds.) (Karger, Basel-New York) 66-83, 1972

64. Schmid-Schönbein, H., E.Volger und H.J.Klose:
Pflügers Arch. 333, 140-155, 1972
65. Schmid-Schönbein, H., J.Weiss und H.Ludwig:
Blut, XXVI, 369-379, 1973
66. Schmid-Schönbein, H. und L.Heinich:
Res.exp. Med. 161, 49-57, 1973
67. Schmid-Schönbein, H., H.J.Klose, E.Volger und J.Weiss:
Res.exp. Med. 161, 58-68, 1973
68. Schmid-Schönbein, H., J.v.Gosen, L.Heinich und H.J.Klose:
Microvasc.Res. 6, 366-376, 1973
69. Schmid-Schönbein, H., J.v.Gosen und H.J. Klose:
Biorheology 10, 545-551, 1973
70. Schmid-Schönbein, H., G.Gallasch, E. Volger und H.J. Klose:
Biorheology 10, 213-227, 1973
71. Schmid-Schönbein, H., K.A.Kline, L. Heinich, E.Volger und
T. Fischer:
Pflügers Arch. 354, 299-317, 1975
72. Singer, S.J. und G.L.Nicholson:
Science 175, 720, 1972
73. Specter, W.S.: Handbook of biological data;
Sounders Company, Philadelphia London 1956
74. Stone, H.O., H.K.Thompson und K. Schmidt-Nielsen:
Am.J.Physiol. 214, 913-918, 1968
75. Taylor, G.I.:
Proc.Roy.Soc.(Lond.) 138 A, 41-44, 1932
76. Taylor, G.I.:
Proc.Roy.Soc.(London) Ser A 146, 501-523, 1934
77. Uhlenbruck, G., G.V.F. Seaman and R.R.A. Coombs:
Vox Sang. 12, 420-428, 1967

78. Usami, S.:
Am.J.Physiol. 217, 884-890, 1969
79. Usami, S. und G. Chien:
Bibl. Anat. II, 91-97, 1973
80. Volger, E., H.Schmid-Schönbein und J.v.Gosen:
Pflüger's Arch. 354, 319-337, 1975
81. Weidenreich, F.:
Pflügers Arch. ges. Physiol. 132, 143-147, 1910
82. Wells, R., H.Schmid-Schönbein und S. Bygde man:
Bibl. Anat. 10, 92-98, 1969
83. Wells, R.E. und H. Schmid-Schönbein:
J.appl.Physiol. 27, 213-217, 1969
84. Wiederhielm, C.A. and L. Billig:
Effects of erythrocyte orientation on lieght transmission
through blood flowing through microscopic blood vessels.
Proc. 1st Int.Conf., Reykjavik 1966. In: Hemorheology (Ed.)
A.L. Copley, Pergamon Press (Oxford-London-Edinburgh)
681-692, 1968
85. Zijlstra, W.G.: Reflexionsoxymetrie;
Oxymetrie, I.Bremer Koll. Thieme, 98-116, 1960 a
86. Zijlstra, W.G.: Syllektometrie;
Oxymetrie, I.Bremer Koll. Thieme, 117-119, 1960 b

Herrn Professor Dr.med. K.Kramer und Herrn Professor Dr.med. H.Schmid-Schönbein danke ich für die Überlassung des Themas und die Möglichkeit, die vorliegenden Untersuchungen in ihren Laboratorien durchführen zu können und für die zahlreichen Anregungen und Diskussionen.

Herrn Feinmechanikermeister W. Klotz und Feinmechanikermeister R. Effenberger danke ich besonders für ihre Hilfe bei der Konstruktion des gegenrotatorischen Rheoskops. Außerdem danke ich allen Mitarbeitern die mir bei der Arbeit geholfen haben.

Die für die Arbeit verwendeten Miniaturschweine erhielten wir dankenswerterweise vom Vetrinärmedizinischen Hygieneinstitut der Universität München.

Lebenslauf

Name: von GOSEN
Vornamen: Justus, Theodor
Geb.Datum: 31.10.1946
Geb.Ort: Prien a. Chiemsee, Wohnort
Eltern: Vater: Markus von Gosen, Kunstmaler
Mutter: Hedwig von Gosen
Ausbildung: 1953-58 Volksschule Prien
1958-67 Ludwig-Thoma-Gymnasium Prien
Abschluß: Abitur
1967-73 Studium der Humanmedizin an der
LMU München
Abschluß: Staatsexamen
1970-74 Doktorarbeit am Physiologischen
Institut der LMU München
Medizinalassistentenzeit:
Jan. 74- Aug. 74 Physiologisches Institut
der LMU München
Okt. 74- Feb. 75 Med. Klinik 1 der LMU
München, Großhadern
Juni 75- Sept. 75 Städt. Krankenhaus Neuper-
lach, 1.Chir.Abt.
Nov. 75 Approbation als Arzt

